

Veterinär-Anatomisches Institut  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Alois Boos

Arbeit unter Leitung von Mariusz P. Kowalewski, PhD

**Expression und mögliche Funktionen des Peroxisom-Proliferator aktivierter  
Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) im kaninen Corpus luteum und in der Plazenta  
während der Trächtigkeit und der normalen sowie induzierten Geburt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Andrea Meyer**

Tierärztin  
von Willisau-Land, LU

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Alois Boos, Referent

PD Dr. med. vet. Iris Reichler, Korreferentin

Zürich 2011



*Meiner Familie*



# Inhalt

1	Zusammenfassung .....	5
2	Summary .....	7
3	Einleitung .....	9
4	Literaturübersicht .....	13
4.1	Der Zyklus der Hündin .....	13
4.1.1	Anöstrus .....	13
4.1.2	Proöstrus .....	13
4.1.3	Östrus .....	14
4.1.4	Diöstrus .....	15
4.2	Corpus luteum .....	17
4.3	Luteotrope Faktoren .....	18
4.3.1	Prostaglandine .....	18
4.3.2	Steroide .....	19
4.3.3	Luteinisierendes Hormon und Prolaktin .....	23
4.3.4	VEGF-System .....	23
4.4	Luteolytische Faktoren .....	27
4.4.1	Prostaglandine .....	27
4.4.2	Immunsystem .....	31
4.5	Plazenta .....	33
4.5.1	Synthese und Rolle von Prostaglandinen in der Plazenta .....	35
4.5.2	Synthese und Rolle von Steroiden in der Plazenta .....	36
4.6	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) .....	39
4.6.1	PPAR $\gamma$ .....	41
4.6.2	PPAR $\gamma$ im Ovar .....	42
4.6.3	PPAR $\gamma$ in der Plazenta .....	43
5	Ziel der Arbeit .....	47
6	Material und Methoden .....	49
6.1	Probematerial .....	49
6.1.1	Normale Trächtigkeit .....	49
6.1.2	Induzierter Abort .....	50
6.2	Immunhistochemie .....	51

6.2.1	Vorgehen .....	52
6.3	Western Blot .....	55
6.3.1	Proteinisolierung .....	55
6.3.2	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), Transfer und Detektion.....	55
6.3.3	In vitro Transkription von pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmid.....	58
6.3.4	Auswertung .....	59
6.4	Qualitative RT-PCR .....	60
6.4.1	RNA-Isolierung.....	60
6.4.2	DNase-Behandlung .....	61
6.4.3	Reverse Transkription (RT) .....	62
6.5	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	63
6.5.1	TaqMan PCR-Prinzip.....	63
6.5.2	Durchführung der Real Time PCR.....	63
6.5.3	Auswertung .....	65
6.6	Statistische Verfahren.....	67
7	Ergebnisse .....	69
7.1	Expression von PPAR $\gamma$ im Corpus luteum der Hündin im Verlauf der normalen Trächtigkeit.....	69
7.1.1	Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation von PPAR $\gamma$ .....	69
7.1.2	Real Time (TaqMan) PCR .....	72
7.1.3	Western Blot.....	73
	Expression des pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmids mittels TNT-Kit.....	73
	Darstellung des PPAR $\gamma$ -Proteins.....	74
7.2	Expression von PPAR $\gamma$ im CL der Hündin bei induziertem Abort.....	76
7.2.1	Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$ .....	76
7.2.2	Real Time (TaqMan) PCR .....	76
7.3	Expression von PPAR $\gamma$ in der uteroplazentären Einheit der Hündin im Verlauf der normalen Trächtigkeit .....	78
7.3.1	Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$ .....	78
7.3.2	Real Time (TaqMan) PCR .....	82
7.3.3	Western Blot.....	83
7.4	Expression von PPAR $\gamma$ in der uteroplazentären Einheit der Hündin bei induziertem Abort.....	85

7.4.1	Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$ .....	85
7.4.2	Real Time (TaqMan) PCR .....	87
8	Diskussion .....	89
9	Literaturverzeichnis.....	95
10	Anhang .....	115
10.1	Puffer und Lösungen .....	115
10.2	Reagenzien.....	120
10.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	123
11	Danksagung .....	125
12	Lebenslauf .....	127





# 1 Zusammenfassung

PPAR $\gamma$ , ein nukleärer Hormonrezeptor, spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Reproduktion; er moduliert die steroidogene Kapazität der reproduktiven Organe und beeinflusst die Trophoblastdifferenzierung.

Untersucht wurden mittels Ovariohysterektomie (OHE) entnommene Corpora lutea (CL) und uteroplazentäre Einheiten von Hündinnen an den Tagen 8-12 (Präimplantation; n=5), 18-25 (Postimplantation; n=5), 35-40 (mittlere Trächtigkeit; n=5) und während der präpartalen Luteolyse (n=3). Zusätzlich wurde während der mittleren Trächtigkeit (n=10) mit dem Antigestagen *Aglepriston* ein Abort ausgelöst (10mg/kg 2x/24Std.). Die OHE wurde 24 und 72Std. nach der zweiten Injektion durchgeführt.

PPAR $\gamma$  wurde immunhistochemisch in Luteinzellen und Trophoblastzellen nachgewiesen. Western Blot und Real Time PCR zeigten im CL und uteroplazentären Gewebe eine Aufregulation während der Implantation und mittleren Trächtigkeit, gefolgt von einer Verminderung während der Luteolyse. Alle Veränderungen zeigten sich am deutlichsten auf Proteinebene. Die Behandlung mit *Aglepriston* führte zur lutealen und plazentären PPAR $\gamma$ -Downregulation. Die Daten sprechen für eine wichtige Rolle von PPAR $\gamma$  in der kaninen Reproduktion, vermutlich über die Regulation von Implantation und Trophoblastinvasion.

Schlüsselwörter:

PPAR $\gamma$ , Hündin, Corpus luteum, uteroplazentäre Einheit



## 2 Summary

PPAR $\gamma$  is a nuclear hormone receptor that plays multiple roles in regulating function of reproductive tissues; it modifies their steroidogenic capacity and modulates the trophoblast differentiation.

Corpora lutea (CL) and uteroplacental units of bitches were analyzed on days 8-12 (pre-implantation; n=5), 18-25 (post-implantation; n=5), 35-40 (mid-gestation; n=5) and during prepartal luteolysis (n=3); tissues were collected via ovariohysterectomy (OHE). In addition, mid-pregnant animals (n=10) were treated with the antigestagen *Aglepristone* (10mg/kg, 2x/24h) to induce abortion; OHE was performed 24 and 72hours after the second injection.

Within the CL immunohistochemistry localized PPAR $\gamma$  to the lutein cells, placental localization was in the trophoblast. As revealed by western blot and real time PCR, PPAR $\gamma$  was upregulated during implantation and mid-gestation in both compartments, followed by a prepartal downregulation. All changes were stronger pronounced at the protein level. The interference of *Aglepristone* with luteal and placental progesteron receptor led to a downregulation of PPAR $\gamma$ . These data suggest that PPAR $\gamma$  may be a factor involved in canine reproduction, possibly through regulating the processes of implantation and trophoblast invasion.

Keywords:

PPAR $\gamma$ , bitch, Corpus luteum, uteroplacental unit



### 3 Einleitung

Hunde sind monoöstrische Tiere, deren Zyklus nicht saisonal ausgeprägt ist. Viele der endokrinen Mechanismen, welche die Fortpflanzung kontrollieren, sind derzeit noch unklar. Im Gegensatz zu vielen anderen Tierarten ist die Plazenta des Hundes ist nicht der Bereitstellung von Progesteron für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beteiligt. So sind die Corpora lutea (CL) die einzige bekannte Quelle für das Progesteron (Hoffmann *et al.*, 1994).

Interessanterweise ist die funktionelle Lebensspanne der CL bei trächtigen und nicht-trächtigen Tieren beinahe identisch (Übersicht bei Concannon *et al.*, 1999; Nishiyama *et al.*, 1999). Während der ersten 20 - 30 Tagen der Gravidität sind die CL unabhängig von gonadotropen Stimuli (Okkens *et al.*, 1986; Concannon *et al.*, 1987). Ab dem 2. Drittel der Trächtigkeit werden das luteinisierende Hormon (LH) und v.a. Prolaktin (PRL) essentielle luteotrope Faktoren (Concannon, 1980; Okkens *et al.*, 1990; Onclin *et al.*, 1993; Onclin & Verstegen, 1997). Auch bei der ingraviden Hündin spielen diese Faktoren eine wichtige Rolle. Trotz erhöhten Verfügbarkeit von LH und Prolaktin kommt es gegen Ende des Diöstrus zur lutealen Rückbildung (Hoffmann *et al.*, 1999). Kürzlich untersuchten Kowalewski *et al.* (2006; 2008a, b; 2010) die Rolle der lutealen Prostaglandine bei diesem Vorgang bei ingraviden und graviden Hündinnen. Die Ergebnisse weisen jedoch eher auf einen luteotropen Effekt der Arachidonsäure-Metaboliten hin, wobei v.a. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) während der ersten Hälfte der lutealen Phase eine wichtige Rolle zu übernehmen scheint. Der luteolytische Effekt von ProstaglandinF<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) ist offensichtlich von geringer Bedeutung.

Ferner wurde die potentielle Rolle von Prostaglandinen, welche von der Plazenta gebildet werden, untersucht (Kowalewski *et al.*, 2010). Dabei konnte klar gezeigt werden, dass alle wichtigen Komponenten des Prostaglandinsystems in der uteroplazentären Einheit der Hündin exprimiert werden. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass der präpartale Anstieg von PGF<sub>2α</sub> im mütterlichen Blut, welcher im Zusammenhang mit dem Einsetzen der Geburt nachgewiesen werden konnte (Nohr *et al.*, 1993), von der aufregulierten Expression des Enzyms Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in den fetalen Trophoblastzellen stammt. Der sinkende Progesteronspiegel scheint bei diesem Prozess eine Signalfunktion auszuüben (Kowalewski *et al.*, 2010).

Prostaglandine wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei PGF<sub>2α</sub> ist dies der PGF<sub>2α</sub>-Rezeptor (PGFR) und bei PGE<sub>2</sub> sind es die vier Isotypen der PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP 1 – 4. Es

werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre umgewandelt und verschiedene *second messenger* Systeme aktiviert (Arosh *et al.*, 2004).

Unterschiedlichste endogene Faktoren wie Eikosanoide, Fettsäuren sowie Cyclooxygenase-, Lipoxygenase- und Epoxygenase-Metaboliten der Arachidonsäure, alles endokrine Faktoren der Fortpflanzung, können alternativ ihre Funktion über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  (engl.: *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), kurz PPAR $\gamma$ , ausüben (Übersicht bei Komar, 2005). Somit könnte PPAR $\gamma$  als alternativer, intrazellulärer Rezeptor für diese Faktoren eine Rolle spielen.

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren sind eine Gruppe von nukleären Hormonrezeptoren aus der Steroidrezeptor-Superfamilie, zu denen auch die Östrogen- und Progesteronrezeptoren gehören. Derzeit sind drei verschiedene Isoformen von PPAR's bekannt:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  und  $\gamma$ . Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine essentielle Rolle bei der Differenzierung, der Entwicklung und dem Stoffwechsel von Zellen (Übersicht bei Berger & Moller, 2002 und Komar 2005).

Die Expression von PPAR $\gamma$  und sein Einfluss auf die Regulation der gonadalen Funktion ist bei verschiedenen Spezies gut dokumentiert worden (Übersicht bei Komar, 2005 und Froment *et al.*, 2006). Nach der Aktivierung durch Liganden ist PPAR $\gamma$  in der Lage, die Expression steroidogener Enzyme in den Fortpflanzungsorganen zu regulieren und zu modulieren. Die essentielle Rolle von PPAR $\gamma$  bei der Ovarfunktion wurde durch die Arbeit von Kim *et al.* (2008) verdeutlicht. Diese Gruppe konnte nachweisen, dass bei Mäusen die spezifische Deletion des PPAR $\gamma$ -Gens in den Granulosazellen eine reduzierte Ovulationsrate zur Folge hat. Ebenso reguliert PPAR $\gamma$  die Expression der Progesteronrezeptor-kontrollierten Gene (PR) und ist somit ein Schlüsselfaktor bei der Ovulation. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Steroidogenese in den Leydig-Zellen ist (Kowalewski *et al.*, 2009b).

Schaiff *et al.* (2000) und Barak *et al.* (1999) zeigten eine weitere wichtige Rolle von PPAR $\gamma$  während der Implantation und Plazentation. Dabei beeinflusst PPAR $\gamma$  die biochemische und morphologische Differenzierung der Trophoblastzellen. In der humanen Plazenta wurde gegen Ende der Schwangerschaft PPAR $\gamma$  vorwiegend in der fetomaternalen Kontaktzone, speziell in den fetalen Trophoblastzellen, lokalisiert (Asami-Miyagishi *et al.*, 2004). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Funktion von PPAR $\gamma$  während der Trophoblastinvasion.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PPAR $\gamma$  eine wichtige und vielfältige Rolle bei der Regulation der Reproduktion spielt.

Für den Hund sind bislang noch keine Daten über diesen Transkriptionsfaktor erhoben worden. Daher ist das Ziel der vorliegende Arbeit, die ersten Informationen über die Expression, die Lokalisation und mögliche Funktionen von PPAR $\gamma$  im CL und in der uteroplazentären Einheit der Hündin zu gewinnen. Dazu wurden Hündinnen während der Trächtigkeit sowie der normalen und induzierten präpartalen Luteolyse untersucht. Die präpartale Luteolyse wurde mit dem Antigestagen *Aglepriston* induziert. Aus einer kürzlich publizierten Studie von Kowalewski *et al.* (2010) geht hervor, dass die Blockierung des plazentären Progesteronrezeptors die Zell-zu-Zell-Kommunikation zwischen den maternalen Dezidual- und den fetalen Trophoblastzellen beeinflusst, was in einer Aktivierung des uteroplazentären Prostaglandinsystems resultiert. Es wird eine Aufregulation von Cox-2 während der präpartalen sowie induzierten Luteolyse beobachtet. Der hier angestellte Vergleich der normalen und induzierten Luteolyse soll einen weiteren Einblick in die Signalkaskade geben, die zur Geburt bzw. zum Abort führt.





## 4 Literaturübersicht

### 4.1 Der Zyklus der Hündin

Der Fortpflanzungszyklus des Hundes (*Canis familiaris*) unterscheidet sich in einigen Aspekten grundlegend von dem anderer Tierarten. In diesem Kapitel wird die Physiologie des Zyklus erläutert und auf einige Besonderheiten bei der Hündin hingewiesen.

#### 4.1.1 Anöstrus

Als Anöstrus wird jene Phase im Zyklus definiert, in der sich die Hündin in sexueller Ruhe befindet. Dieser Zeitraum ist je nach Hund und Rasse unterschiedlich lang und dauert 15 – 265 Tage mit einem durchschnittlichen Wert von 125 Tagen (Christiansen, 1984). Dagegen dauert die Trächtigkeit im Durchschnitt  $63 \pm 2$  Tage (Tsutsui, 1989), somit ist der nicht-trächtige Zyklus einer Hündin länger als die Trächtigkeit selbst.

Das äussere Genitale ist während des Anöstrus klein und unauffällig. Die Vaginalschleimhaut ist leicht feucht, glatt und blassrosa. Die Vaginalzytologie ist zellarm: es finden sich wenige Parabasal- und Basalzellen, etwas Schleim und vereinzelt Leukozyten (Noakes *et al.*, 2009).

Die Hormonspiegel befinden sich auf einem tiefen Niveau (Abb. 4.1.4). Die Progesteronwerte sind  $< 1$  ng/ml (Olson *et al.*, 1982). Estradiol-17 $\beta$ , PRL, follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) werden in geringen Mengen produziert. Erst im mittleren bis späten Anöstrus wird LH vermehrt mit steigender Pulsfrequenz ausgeschüttet (Hoffmann *et al.*, 1996). Gleichzeitig steigt der Gehalt an FSH im peripheren Blut an (240 – 294 ng/ml), gefolgt von einem deutlichen Abfall zu Beginn des Proöstrus (131 – 200 ng/ml) (Olson *et al.*, 1982).

#### 4.1.2 Proöstrus

Der Beginn des Proöstrus ist gekennzeichnet durch die steigende Konzentration von Östrogenen (Abb. 4.1.4) (Arbeiter, 1994). Im peripheren Blut können Estradiol-17 $\beta$ -Werte bis zu 110 pg/ml gemessen werden (Olson, 1982). Produziert wird Estradiol-17 $\beta$  in den wachsenden Ovarialfollikeln (Arbeiter, 1994).

Äusserlich wird diese hormonelle Veränderung durch eine Ödematisierung von Vulva und Perineum deutlich und man kann den Abgang von glasklarem bis weisslich-grauem oder blutigem Schleim beobachten (Noakes *et al.*, 2009). Die Vaginalschleimhaut wird zunehmend ödematisiert und ist durch eine markante Felderung gekennzeichnet (Noakes *et al.*, 2009). Durch die Zunahme der Epithelschichten erscheint sie porzellanweiss. Der Ausfluss enthält immer mehr Erythrozyten und wird fleischwasserfarben. Nach Christiansen (1984) wird die Hündin bereits zu diesem Zeitpunkt für Rüden attraktiv, duldet aber noch keinen Aufsprung. Der Proöstrus dauert 3 – 17 Tage, im Mittel 9 Tage (Noakes *et al.*, 2009). Im Vaginalabstrich treten Erythrozyten, Leukozyten, Parabasal- und hohe Intermediärzellen auf und der Anteil an verhornten Superfizialzellen nimmt zu (Christie *et al.*, 1972; Noakes *et al.*, 2009).

Gegen Ende des Proöstrus sinkt der Estradiol-17 $\beta$ -Spiegel (Hoffmann *et al.*, 1992) und die Progesteronkonzentration beginnt anzusteigen (Abb. 4.1.4) (Olson *et al.*, 1982).

LH wird pulsatil und in geringen Mengen ausgeschüttet (Colon *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 1996). Die Konzentration von FSH ist wahrscheinlich wegen der negativ-rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  und Inhibin (beides in Granulosazellen der Follikel gebildet) am niedrigsten (Olson *et al.*, 1982).

### **4.1.3 Östrus**

Äusserlich geprägt wird der Östrus vom Duldungsverhalten der Hündin und dauert im Mittel 9 Tage. Vaginoskopisch wirkt die Schleimhaut blass, trocken und es ist eine Sekundärfältelung sichtbar. Auf dem Scheidenabstrich sind fast ausschliesslich verhornte Superfizialzellen. Äusserlich nimmt die Ödematisierung der Vulva wieder ab (Noakes *et al.*, 2009).

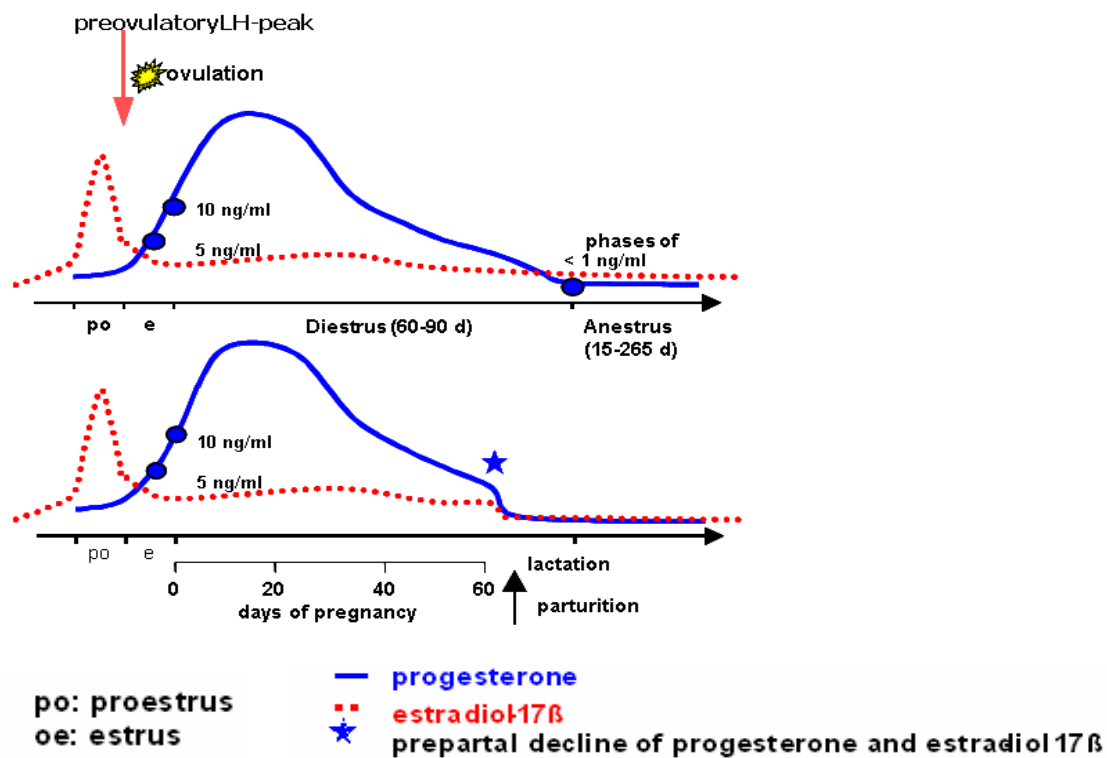
Im Blut steigt der Gehalt an zirkulierendem LH und FSH an. Der präovulatorische LH-Peak erreicht durchschnittliche Werte von 402 ng/ml, fällt aber spätestens nach drei Tagen auf Basalwerte (2 bis 4 ng/ml) ab. FSH erreicht maximale Werte 1 – 2 Tage nach dem LH-Peak und es können Konzentrationen bis zu 208 ng/ml beobachtet werden. Der Progesteronspiegel (Abb. 4.1.4) steigt am Tag der maximalen LH-Konzentration über 1 ng/ml an (Reimers *et al.*, 1978; Olson *et al.*, 1982). Die Luteinisierung der Tertiärfollikel ist für die zunehmenden Progesteronwerte verantwortlich (Colon *et al.*, 1993).

36 - 48 Stunden nach dem LH-Peak reifen die Graaf'schen Follikel zu sprungreifen Follikeln an und es kommt zur Ovulation. Der Zeitpunkt der Ovulation wird als der Tag definiert, an dem das Progesteron im Plasma auf 5ng/ml oder mehr ansteigt (Übersicht bei Concannon *et al.*, 1989). Die Maximalwerte werden in den ersten 20 Tagen nach Ovulation erreicht (Abb. 4.1.4) (Concannon, 1993).

#### **4.1.4 Diöstrus**

Die Dauer des Diöstrus schwankt zwischen 80 - 110 Tagen (Arbeiter, 1994). Mit Beginn dieser Phase verschwindet das Duldungsverhalten der Hündin. Äusserlich wird die Vulva deutlich kleiner. Der Ausfluss verändert sich sichtbar, seine Menge nimmt ab und er wird zunehmend weisslich-gelblich und schleimig. Die Schleimhaut erscheint vaginoskopisch blassrosa und feucht. Im Ausstrich findet man immer weniger verhornte Superfizialzellen, dafür nimmt der Gehalt an Intermediär- und Basalzellen stetig zu und es dominieren die Leukozyten (Noakes *et al.*, 2009).

Die Estradiol-17 $\beta$ -, LH- und Progesteron-Konzentrationen im Blut (Abb. 4.1.4) sind bei trächtigen sowie nicht-trächtigen Hündinnen im weiteren Verlauf des Zyklus bzw. bis kurz vor dem Geburtszeitpunkt beinahe identisch (Reimers *et al.*, 1978; Übersicht bei Concannon *et al.*, 1989). Bei der ingraviden Hündin sinken Estradiol-17 $\beta$  und Progesteron am Ende des Zyklus allmählich auf die Basalwerte ab, wohingegen bei der trächtigen Hündin der präpartale Abfall innerhalb von 24 - 48 Stunden geschieht und vermutlich Prostaglandin-vermittelt ist (Abb. 4.1.4) (Concannon *et al.*, 1988; Hoffmann *et al.*, 1992; Concannon, 1993; Hoffmann *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1999; Kowalewski *et al.*, 2010).



**Abb. 4.1.4:** Schematische Darstellung der Verlaufskurven von Progesteron und Estradiol-17β bei der graviden und ingraviden Hündin (Hoffmann *et al.*, 1999).

Relaxin ist das einzige bekannte Hormon, dessen Verlauf zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Hündinnen deutlich variiert. Nur bei der graviden Hündin kann Relaxin ab der 3. Trächtigkeitswoche im Blut nachgewiesen werden (Steinetz *et al.*, 1987).

## 4.2 Corpus luteum

Beim CL handelt es sich um eine Drüse, die endokrine Funktionen ausübt. Die Lebensdauer eines CL ist tierartlich unterschiedlich und zeitlich begrenzt (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000). Die Lebensspanne der CL von ingraviden Hündinnen übersteigt jene von graviden Tieren und kann über 80 Tage dauern.

Durch die präovulatorische Gonadotropinausschüttung wird die Ovulation induziert und es kommt zur Differenzierung der Follikelzellen. Die Theka- und Granulosazellen luteinisieren und bilden das CL (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000). Beim Hund kann man histologisch nur einen Typ von Luteinzellen beobachten (Andersen & Simpson, 1973). Dies steht im Gegensatz zu den meisten nicht-primaten Spezies, bei denen die Zellen in grosse (von Granulosazellen stammend) und kleine (von Thekazellen stammend) Luteinzellen unterteilt werden können (König & Liebich, 1999). Die Follikelzellen produzieren Estradiol-17 $\beta$ , wohingegen die Luteinzellen, die sich aus den Follikelzellen entwickeln, neben geringen Mengen an Estradiol-17 $\beta$  vorwiegend Progesteron produzieren (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000).

Bei der graviden Hündin kann nach Andersen und Simpson (1973) die strukturelle Entwicklung des CL in drei Phasen unterteilt werden: die Bildung an den Tagen 0 - 20 post coitum (p.c.), die Differenzierung (Tage 21 - 44 p.c.) und die Regression bis zum Tag 60.

Bei der ingraviden Hündin sind bis zum 45. Tag post ovulationem (p.o.) elektronenmikroskopisch typische morphologische Anzeichen der Proliferation gut erkennbar (Sonnack, 2009). Danach sind zunehmend Anzeichen der Regression erkennbar, bis diese am 75. Tag deutlich überwiegen. Ab dem 60. Tag p.o. kann auch Apoptose nachgewiesen werden, welche jedoch im Gegensatz zu anderen Spezies nur von untergeordneter Bedeutung sein soll (Sonnack, 2009).

Neben den steroidogenen Zellen finden sich im CL auch Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten und Zellen aus dem Blutstrom (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000). Ferner konnte eine vermehrte Anwesenheit von Immunzellen (CD4-, CD8-, MHC II-positive Zellen) während der lutealen Proliferation gezeigt werden (Büsges, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004a). Dies könnte auf eine para/autokrine Wirkungsweise der Zytokine aus Leukozyten, der Prostanoiden aus Lutealzellen und der Steroide hindeuten.

### 4.3 Luteotrope Faktoren

Luteotrope Mechanismen unterstützen das Wachstum und/oder die Funktion des CL. Unter anderem werden LH, PRL, Wachstumshormone (GH), Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1), Oxytozin, Prostaglandine (PG), insbesondere PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> als luteotrope Hormone genannt (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000).

#### 4.3.1 Prostaglandine

Fast alle Zellen des Körpers sind zur Synthese von Prostaglandinen befähigt. U.a. werden sie in den CL zahlreicher Spezies produziert, wie beispielsweise bei Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf, Rind, Pferd und Mensch (Übersicht bei Wiltbank & Ottobre, 2003). Es werden ihnen luteotrope wie auch luteolytische Wirkungen zugeschrieben (Fitz *et al.*, 1984; Shelton *et al.*, 1990) (Kap. 4.4.1). Aus mehrfach ungesättigten, membranständigen Phospholipiden wird durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> Arachidonsäure gebildet (Nelson & Cox, 2001). Dies ist die Vorstufe aller Eikosanoide, zu denen die Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline und Leukotriene gehören.

Unter der Einwirkung von Lipoxygenasen entstehen aus der Arachidonsäure die Leukotriene (Nelson & Cox, 2001). Ihre Rolle im Stoffwechsel steht im Zusammenhang mit entzündlichen und allergischen Reaktionen (Nelson & Cox, 2001).

Prostaglandine entstehen durch die Einwirkung der Cyclooxygenase (Cox) auf die Arachidonsäure. In einem ersten Schritt entsteht Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und in einem zweiten das Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (Nelson & Cox, 2001; Madore *et al.*, 2003). Diese instabilen Zwischenformen werden anschliessend durch verschiedene Enzyme in unterschiedliche Endformen umgewandelt: Thromboxan A<sub>2</sub> entsteht durch die Thromboxan-Synthase, Prostacycline durch Prostacyclin-Synthase, die Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) durch die Endoperoxidaseisomerase und durch Reduktasen entsteht Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Nelson & Cox, 2001).

Die Cyclooxygenase gilt als das Schlüsselenzym bei dieser Reaktion. Man kann zwei Isoformen unterscheiden: eine konstitutive Form, Cox-1, und eine induzierbare Form, Cox-2 (Übersicht bei Herschman, 1996; Nelson & Cox, 2001). Cox-1 wird in den meisten Geweben des Körpers kontinuierlich exprimiert. Dagegen wird Cox-2 nur bei Entzündungsprozessen oder unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren und nur in bestimmten

Gewebe induziert (z.B. Prostata, Nieren, Uterus, Gehirn und Tumorgewebe) (Übersicht bei Herschman, 1996).

Die Wirkung der Prostaglandine wird über transmembranöse Rezeptoren vermittelt, die an G-Proteine gekoppelt sind. Mittels sekundären Botenstoffen (*second messenger* Systeme, z.B.: cAMP, Inositoltriphosphat) werden extrazelluläre in intrazelluläre Signale umgewandelt.

Für PGE<sub>2</sub> wurden beim Rind 4 Rezeptorsubtypen kloniert (EP 1 – 4), welche alle durch verschiedene Gene kodiert werden (Arosh *et al.*, 2004). Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von EP2 in kleinen und grossen Luteinzellen nachgewiesen. Dabei wurde die höchste Expression von EP2, mRNA und Protein, in der frühen und mittleren CL-Phase beobachtet. EP3 zeigte seine maximale mRNA-Expression gegen Ende der lutealen Phase (Arosh *et al.*, 2004).

Beim Hund ist während der ersten 20 Tage das CL bei graviden wie ingraviden Tieren unabhängig von hypophysären gonadotropen Stimuli (Okkens *et al.*, 1986, Concannon *et al.*, 1987). Kowalewski *et al.* (2006, 2008a) konnten eine zyklusabhängige Expression von Cox-2 im CL trächtiger Hündinnen nachweisen. Cox-1 dagegen verhält sich wie ein *House-keeping Gene*. Die Expression der Prostaglandinsynthase E (PGES) zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie Cox-2, welches während der CL-Bildung aufreguliert wird und anschliessend in der Regressionsphase abfällt. Den lokal im CL produzierten Prostaglandinen der E-Reihe könnte somit eine luteotrope Wirkung zugeschrieben werden (Kowalewski, 2007; Kowalewski *et al.*, 2008a).

#### **4.3.2 Steroide**

Zu den wichtigsten Steroidhormonen, die vom Ovar gebildet werden und an der Regulation der CL-Funktion beteiligt sind, gehören Progesteron und Östrogene.

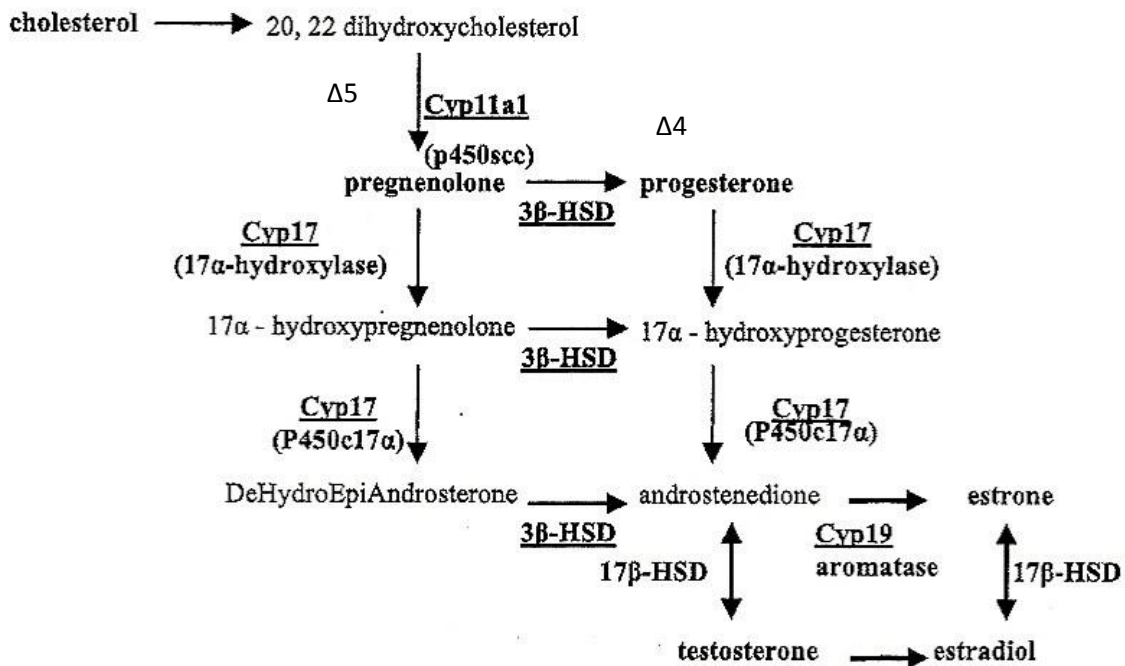
Alle Steroidhormone werden aus der Vorstufe Cholesterol synthetisiert. Cholesterol wird in Form von Lipoproteinen (*low-density*- und *high-density*-Lipoproteine, bzw. LDL und HDL) aus der Leber zu den steroidproduzierenden Geweben, wie Nebennieren, Hoden, Follikeln und Gelbkörpern, transportiert. Mit Hilfe des *steoidogenic acute regulatory protein*, kurz StAR-Protein, wird Cholesterol durch die Mitochondrienmembranen transportiert (Übersicht bei Stocco & Clark, 1996). Beim Hund soll der Cholesterol-Transport von der äusseren zur

inneren Membran den limitierenden Schritt in der Progesteronsynthese darstellen (Kowalewski & Hoffmann, 2008). In den Thekazellen des Follikels entsteht Pregnenolon (P5) nach Spaltung der terminalen C6-Einheit aus der Seitenkette des Cholesterins durch das Enzym P450-Side-Chain-Cleavage (P450<sub>SCC</sub>). Abhängig vom weiteren Verlauf der Biosynthese entsteht aus dem P5 auf dem  $\Delta^4$ -Syntheseweg Progesteron, gefolgt von der Bildung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion oder auf dem  $\Delta^5$ -Syntheseweg der Reihe nach  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion (Abb. 4.3.2) (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000; Nelson & Cox, 2001; Übersicht bei Froment *et al.*, 2006).

Aus Androstendion erfolgt durch Reduktion der 17-Ketogruppe die Produktion von Testosteron. Die Biosynthese der Androgene ist vom Vorkommen des erforderlichen Enzyms  $17\alpha$ -Hydroxylase abhängig (Chedrese, 2009). Bei der Ratte wird dieses Enzym in den grossen wie auch den kleinen Luteinzellen exprimiert, beim Menschen hingegen nur in den kleinen Luteinzellen. Die Bildung von Östrogenen durch die Granulosazellen setzt beim Menschen die Bereitstellung von Androgenen durch die Thekazellen vor der Ovulation voraus (Chedrese, 2009).

Generell werden Androgene durch die P450-Aromatase, welche auch im CL exprimiert wird, in Östrogene umgewandelt (Chedrese, 2009).





**Abb. 4.3.2:** Schematische Darstellung der Syntheseschritte, die zu Progesteron, Östrogenen und Testosteron führen (Übersicht bei Froment *et al.*, 2006).

Die Granulosazellen sind zur Progesteronsynthese fähig, da sie mit dem Enzym 3 $\beta$ -Hydrosteroid-Dehydrogenase $\Delta$ 4/5-Isomerase (3 $\beta$ HSD) ausgestattet sind. Dieses Enzym wurde ausser in steroidproduzierenden auch in einigen nicht-steroidproduzierenden Geweben nachgewiesen, z.B. in den Schweissdrüsen des Menschen und der Ratte (Muir *et al.*, 1970).

LH induziert die Aktivität von StAR, welches wie bereits erwähnt für den Cholesterin-Transport von der äusseren zur inneren Mitochondrienmembran zuständig ist (Übersicht bei Stocco & Clark, 1996 und Niswender *et al.*, 2000). So fördert LH indirekt die Pregnenolonbiosynthese. In den Granulosazellen wird die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen unter dem Einfluss von FSH ausgelöst (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000).

### Progesteron

Die Menge des synthetisierten Progesterons hängt vom Volumen des Progesteronproduzierenden Gewebe, dessen Durchblutung und seiner Kapazität zur Progesteronsynthese ab. Auf molekularer Ebene werden als limitierende Faktoren für die Steroidsynthese die Expression der für die steroidogenen Enzyme kodierende mRNA sowie die Aktivität der

Mechanismen, die für die zelluläre Aufnahme und den intrazellulären Transport von Cholesterol verantwortlich sind, genannt (Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000).

Die Zugabe von Prostaglandinen der Reihen E und I zu lutealem Gewebe von Rindern, Schafen und Menschen erhöht die Syntheserate von Progesteron. Dies geschieht vermutlich durch eine Erhöhung von cAMP und die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche für die Bereitstellung und Phosphorylierung von StAR verantwortlich ist und dadurch den Transport von Cholesterol von der Mitochondrienmembran zum P450<sub>scc</sub>-Komplex ermöglicht (Stocco & Sodeman, 1991; Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000).

Die Funktion von Progesteron wurde vielfach untersucht. Bereits in den 90er Jahren wurde postuliert, dass Progesteron bei verschiedenen Spezies auf para/autokrinen Wegen luteotrop wirkt (Übersicht bei Rothchild, 1981). Später wurde diese Hypothese durch Untersuchungen bei der Ratte unterstützt (Fanjul *et al.*, 1983; Pridjian *et al.*, 1987). Auch beim Rind weisen Untersuchungen mit bovinen Luteinzellkulturen auf eine para/autokrine Wirkung von Progesteron hin (Skarzynski & Okuda, 1999). Zudem kann durch eine Stimulation mit synthetischen Gestagenen die Progesteronproduktion in Lutein-Zellkulturen stimuliert werden (Pate, 1996). Beim Hund, bei dem die CL die einzig bekannten Progesteronquellen bei trächtigen wie auch nicht trächtigen Hündinnen sind (Übersicht bei Concannon *et al.*, 1989; Nishiyama *et al.*, 1999) ergaben sich ebenfalls Hinweise auf eine para/autokrine Wirkung von lutealem Progesteron (Papa, 2001).

### *Östrogene*

Für Estradiol-17 $\beta$  wurde bei verschiedenen Spezies, wie Schwein, Schaf, Kaninchen, Ratte und dem Menschen luteotrope wie auch luteolytische Wirkung beschrieben (Gibori *et al.*, 1977; Gregoraszczuk, 1996; Hazzard & Stormshak, 1997; Chen *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1999). Grundsätzlich wird dabei von einer para/autokrin vermittelten Wirkung ausgegangen. Während der Trächtigkeit beim Hund befindet sich Estradiol-17 $\beta$  auf einem niedrigen Niveau. Gebildet wird dieses Estradiol-17 $\beta$  im CL (Nishiyama *et al.*, 1999). Seine biologische Funktion ist nicht vollständig geklärt, die Vorbereitung des Genitaltraktes auf die Geburt ist Estradiol-unabhängig (Hoffmann *et al.*, 1999). Wie Progesteron soll auch Estradiol-17 $\beta$  im kaninen CL eine para/autokrine Wirkung besitzen (Papa, 2001).

Bei der Ratte scheint Estradiol-17 $\beta$  einer der Hauptfaktoren mit luteotroper Wirkung zu sein. Bei trächtigen hypophysektomierten Ratten hält Estradiol-17 $\beta$  den Progesterongehalt im

Serum von Tag 12 - 15 aufrecht; gleichzeitig wird die Expression von Östrogenrezeptoren im CL erhöht (Gibori *et al.*, 1977).

Estradiol-17 $\beta$  stimuliert die Progesteronsynthese in Luteinzellen von Kaninchen und wird als wichtigster luteotroper Faktor beschrieben. Es handelt sich hier jedoch um einen indirekten Effekt: die luteotrope Wirkung von IGF-1 wird durch Estradiol-17 $\beta$  potenziert, was sich wiederum positiv auf die Progesteronsynthese auswirkt (Chen *et al.*, 1997).

Auch beim Schaf wird eine luteotrope Wirkung beschrieben. So zeigte Lund (1999), dass ein Mangel an Estradiol-17 $\beta$  zur Insuffizienz präovulatorischer Granulosazellen führt. Zudem bewirkt eine Behandlung von Schafen mit Estradiol-17 $\beta$  nach der Ovulation eine Verlängerung des Interöstrus-Intervalls, dies durch die Verlängerung der CL-Lebensspanne (Hazzard & Stormshak, 1997).

#### **4.3.3 Luteinisierendes Hormon und Prolaktin**

Vom 2. Drittel der Trächtigkeit an werden beim Hund LH und PRL zu wichtigen luteotropen Faktoren, wobei letzteres im Vordergrund steht (Concannon, 1980; Okkens *et al.*, 1990; Onclin *et al.*, 1993; Onclin & Verstegen, 1997). Bei beiden Hormonen konnte ein deutlicher Anstieg der Verfügbarkeit im peripheren Blut festgestellt werden (Gräf, 1978; Hoffmann *et al.*, 1996). Bis zum 35. Tag nach der Ovulation ist der Konzentrationsverlauf des PRLs bei graviden und ingravidem Hündinnen identisch. Danach ist die Konzentration im Plasma gravider Tiere höher (Onclin & Verstegen, 1997) und erst 60 Tage nach der Geburt fällt die Konzentration auf Basalwerte ab (Übersicht bei Olson *et al.*, 1989; Hoffmann *et al.*, 1992). Trotz erhöhter LH- und PRL-Konzentrationen und unveränderter Mengen an den zugehörigen Rezeptoren im CL kommt es zur lutealen Regression (Fernandes *et al.*, 1987; Hoffmann *et al.*, 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass weder bei der trächtigen noch der nicht-trächtigen Hündin die Regression der CL auf einen Mangel an luteotropen Faktoren zurückzuführen ist.

#### **4.3.4 VEGF-System**

Die Neubildung von Gefäßen stellt in ausdifferenzierten Geweben einen relativ seltenen Vorgang dar (Cheung *et al.*, 1998). Ausnahmen bilden gewisse Krankheitsprozesse, wie z.B. Tumorstadium oder chronische Entzündungen und auch die zyklischen Veränderungen am Ovar (Übersicht bei Findlay, 1986 und Reynolds *et al.*, 1992; Chedrese, 2009).

Die Entwicklung neuer Gefäße kann durch zwei Mechanismen stattfinden: zum einen durch Angiogenese, zum anderen durch Vaskulogenese. Werden Gefäße *de novo* gebildet, bezeichnet man diesen Vorgang als Vaskulogenese; dieser Prozess findet nur während der Embryonalentwicklung statt. Als Angiogenese wird die Bildung neuer Kapillaren bezeichnet, die von bereits bestehenden Gefäßen ausgeht. Dazu gehört die Proliferation von Endothelzellen in Verbindung mit einer Remodellierung der schon existierenden Basalmembran und der extrazellulären Matrix (Klagsbrun, 1991; Redmer *et al.*, 2001).

Die Sprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Als erster Faktor, der spezifisch die Proliferation der vaskulären Endothelzellen initiiert, wurde der Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) beschrieben (Übersicht bei Stouffer *et al.*, 2001). Wird VEGF inhibiert, kommt es zu einer verminderten Vaskularisation des CL und somit reduzierten Progesteronproduktion (Fraser *et al.*, 2000, Dickson *et al.*, 2001).

Die VEGF-Familie besteht aus mindestens sechs Hauptisoformen, VEGF A-F. Aus diesen können durch alternatives Splicing wieder mehrere Subtypen entstehen (Ferrara & Keyt, 1997; Übersicht bei Stouffer *et al.*, 2001). Beim Menschen wurden beispielsweise fünf molekulare Isoformen von VEGF-A identifiziert: zwei von ihnen sind membrangebunden (VEGF 189, 206) und drei befinden sich gelöst im Zytoplasma (VEGF 121, 145, 165). Seine Rolle übt VEGF vorwiegend durch die Bindung an Tyrosinkinase-Rezeptoren aus, die auch als VEGF-Rezeptoren (R)-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bezeichnet werden (Ferrara & Keyt, 1997; Übersicht bei Stouffer *et al.*, 2001). Als weitere spezifische Bindungsstellen wurden die transmembranösen NP-1- und NP-2-Rezeptoren (*neutrophil-derived platelet activator*-spezifische transmembranäre Typ I und II Rezeptoren) nachgewiesen. NP-1 bindet VEGF 165 und NP-2 bindet VEGF 145 sowie 165 (Übersicht bei Stouffer *et al.*, 2001).

Als weiterer wichtiger Faktor bei der Angiogenese wurde Angiopoietin (ANGPT) mit zwei Isoformen beschrieben (Chedrese, 2009). Wie auch VEGF bindet ANGPT an Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Rezeptoren Tie-1 und Tie-2. Im Gegensatz zu VEGF kann ANGPT nicht die Endothelzellen stimulieren, sondern es ist essentiell für die Rekrutierung perivaskulärer Zellen, was zur Reifung und Stabilisierung der neu geformten Gefäße führt. ANGPT2 ist ein natürlicher Antagonist von ANGPT1, welches zu einer geringeren Stabilität des kapillären Endothels führt und somit die Migration von Endothelzellen und die Bildung neuer Gefäße fördert (Chedrese, 2009).

Im CL des Schweines wurde mRNA von VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie die Isoform VEGF 164 nachgewiesen (Boonyaparakob *et al.*, 2003). Die mRNA beider Rezeptoren konnte in den kleinen, die mRNA von VEGF 164 überwiegend in den grossen Luteinzellen lokalisiert werden (Boonyaparakob *et al.*, 2003). Die Expression von VEGF 164 war zu Beginn der Lutealphase zunächst konstant, worauf gegen Ende dieser Phase ein Abfall folgte. Bei VEGFR-1 wurde die niedrigste Expression kurz nach der Ovulation gemessen mit nachfolgendem Anstieg bis zum Ende der CL-Phase. Dagegen war die Expression von VEGFR-2 bis zum Tag 12 - 15 p.o., somit bis zum Einsetzen der Luteolyse, hoch; danach folgte ein rascher Abfall (Boonyaparakob *et al.*, 2003).

Beim Rind wurde die Expression von VEGF 121, 165 und 189 in den grossen und kleinen Luteinzellen nachgewiesen (Berisha *et al.*, 2000). Die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 wurden in den Endothelzellen lokalisiert (Übersicht bei Davis *et al.*, 2003). Zu Beginn der CL-Phase, also zur Zeit mit sehr starker angiogenetischer Aktivität des CL, war die Expression von VEGF und den beiden Rezeptoren besonders hoch (Berisha *et al.*, 2000). Durch intramuskuläre Injektion eines PGF<sub>2α</sub>-Analogons beim Rind konnte eine deutliche Reduktion der VEGF- und der zugehörigen Rezeptor-mRNA festgestellt werden (Neuvians *et al.*, 2004). Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Down-Regulation von VEGF eine Rolle bei der strukturellen Luteolyse spielt (Übersicht bei Fraser & Wulff, 2003; Neuvians *et al.*, 2004). Im CL des Schafes wurden die Isoformen VEGF 120, 164 und 188 identifiziert (Redmer *et al.*, 2001). Mittels Immunhistologie wurden sie in den grossen und kleinen Luteinzellen, in den Stromazellen, Perizyten und glatten Gefässmuskelzellen lokalisiert. Ab Mitte der Lutealphase nahm die Anzahl der VEGF-positiven Zellen ab, die verbleibenden Signale wurden überwiegend im perivaskulären Bereich der grossen Blutgefässe und im Bindegewebe der CL-Kapsel beobachtet (Redmer *et al.*, 1996; Redmer *et al.*, 2001).

Beim Hund durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten (Tag 20, 30, 50, 60, und 120 p.o.) im CL positive immunhistochemische Signale für VEGF beobachtet werden konnten (Mariani *et al.*, 2006). VEGF wurde in Luteinzellen, Perizyten, Endothelzellen und im Stroma nachgewiesen. Ein Anstieg der Zahl der immunopositiven Luteinzellen zeigte sich vom Tag 20 bis 60 p.o.. Ein ähnlicher Effekt wurde für den VEGFR-1 beobachtet. Die Expression von VEGFR-2 hingegen nahm im Laufe des Diöstrus in den Lutein- und Endothelzellen signifikant ab. Das Expressionmuster von VEGFR-2 war statistisch signifikant mit dem Verlauf der Progesteronkonzentration korreliert (Mariani *et al.*, 2006). Auch wenn die Regulationsmechanismen, welche dem VEGF-VEGFR-

System im Verlauf des Diöstrus zugrunde liegen, immer noch weitgehend unklar sind, wird auf unterschiedliche Regulationsmechanismen geschlossen, durch welche VEGF-Rezeptoren als para/autokrine Regulationsfaktoren die kanine CL-Funktion beeinflussen können (Tamanini & De Ambrogi, 2004; Mariani *et al.*, 2006).

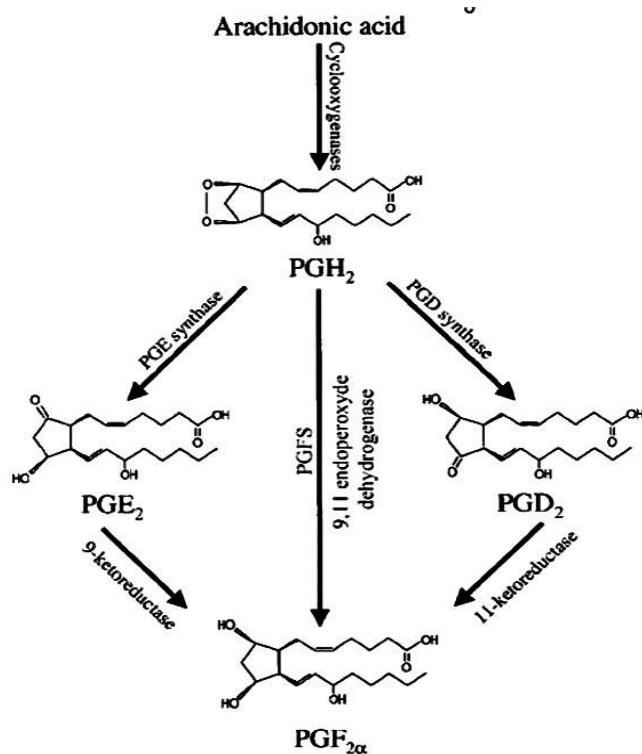
#### 4.4 Luteolytische Faktoren

Die Luteolyse ist als Funktionsverlust des CL definiert (Chedrese, 2009). Im Hinblick auf einen funktionierenden Reproduktionszyklus kommt der Luteolyse eine entscheidende Rolle zu: luteales Progesteron unterdrückt die LH- und FSH-Ausschüttung, wodurch sich keine neuen Follikel ausbilden können bzw. eine Trächtigkeit aufrechterhalten wird. Durch die Luteolyse wird die Progesteronsynthese ausgeschaltet. In der Folge werden neue Follikel gebildet und ein neuer Zyklus beginnt bzw. setzt die Geburt ein (Chedrese, 2009).

Es können zwei Phasen der Luteolyse unterschieden werden: die funktionelle und die strukturelle Luteolyse (Chedrese, 2009). Während die funktionelle Luteolyse durch den Verlust der Fähigkeit zur Progesteronproduktion gekennzeichnet ist, findet man bei der strukturellen Luteolyse histomorphologische Veränderungen, z.B. das Auftreten von apoptotischen Zellen und den Verlust der vaskulären Integrität (Chedrese, 2009).

##### 4.4.1 Prostaglandine

PGF<sub>2α</sub> wird bei Schweinen, Rinden, Pferden, Ratten und Primaten bereits in der frühen Lutealphase im CL synthetisiert (Milvae & Hansel, 1983; Patek & Watson, 1983; Watson & Sertich, 1990; Olofsson *et al.*, 1992). Die Synthese von PGF<sub>2α</sub> aus PGH<sub>2</sub> kann auf drei unterschiedlichen Synthesewegen erfolgen. Zum einen direkt aus PGH<sub>2</sub> durch das Enzym Prostaglandin F<sub>2α</sub>-Synthase (PGFS), welches auch als 9,11-Endoperoxidase-Reduktase bezeichnet wird. Dies gilt als Hauptsyntheseweg. Zum anderen kann die PGF<sub>2α</sub>-Synthese auch über Zwischenstufen von PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub> mit den entsprechenden Enzymen PGE-, PGD-Synthase (PGES und PGDS) und 9-Ketoreduktase bzw. 11-Ketoreduktase erfolgen (Abb. 4.4.1a) (Madore *et al.*, 2003).



**Abb. 4.4.1a:** Synthesewege von PGF<sub>2α</sub> (Madore *et al.*, 2003).

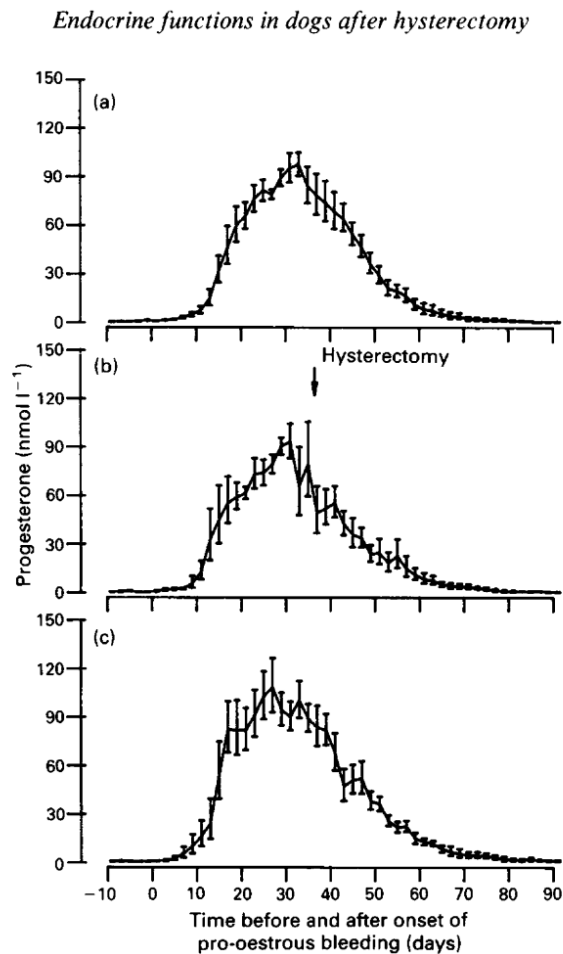
PGF<sub>2α</sub> bindet an den PGF<sub>2α</sub>-Rezeptor (PGFR). Beim Schaf wurden zwei Isoformen beschrieben, PGFR<sub>A</sub> und PGFR<sub>B</sub> (Pierce *et al.*, 1997). Mittels Immunhistochemie haben Arosh *et al.* (2004) die Expression von PGFR in kleinen und grossen Luteinzellen nachgewiesen, wobei dieser vorwiegend in den grossen Luteinzellen lokalisiert war. Die mRNA-Expression von PGFR zeigte einen kontinuierlichen Anstieg von der Bildung bis hin zum reifen CL; darauf folgte eine Abnahme des Rezeptors (Arosh *et al.*, 2004).

Bei vielen Tierarten (Schaf, Rind, Schwein, Stute und Nager) konnte gezeigt werden, dass eine Hysterektomie während des Zyklus zu einer abnormen Persistenz der CL führt. Der Faktor, welcher für den luteolytischen Effekt des Uterus verantwortlich ist, wurde als PGF<sub>2α</sub> identifiziert (Strauss *et al.*, 1975, McCracken *et al.*, 1999). Bei der Luteolyse der CL graviditatis und CL cyclicum der oben genannten Spezies handelt es sich um eine endokrine Wirkung des endometrialen PGF<sub>2α</sub> (McCracken *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu existiert beim Hund kein Luteolysin uterinen Ursprungs. Bei Hunden wie auch beim Menschen beeinflusst eine Hysterektomie den Zyklusverlauf nicht (Abb 4.4.1b) (Übersicht bei Olson *et al.*, 1989; Hoffmann *et al.*, 1992; McCracken *et al.*, 1999; Chedrese, 2009). Vielmehr wird die luteale Regression beim Hund als ein passiver und degenerativer



Prozess beschrieben (Übersicht bei Hoffmann *et al.*, 2004; Kowalewski *et al.*, 2008a; Sonnack, 2009).

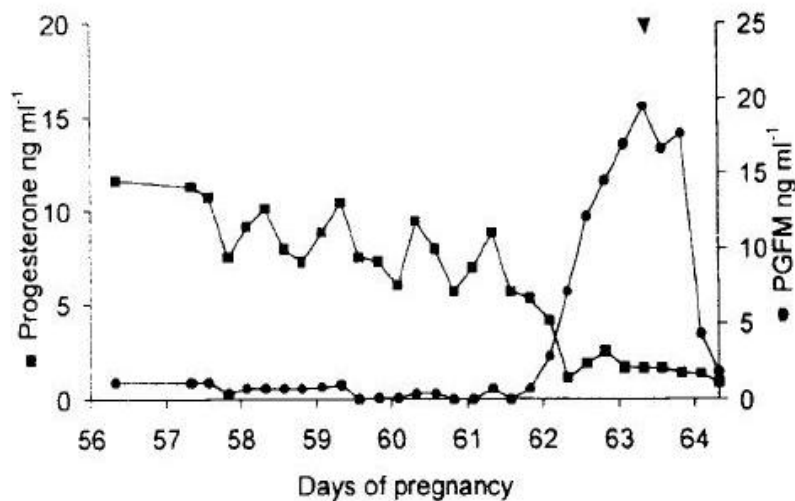


**Abb. 4.4.1b:** Progesteronverlauf im peripheren Plasma bei a) Kontrolltieren, b) Hündinnen im ersten Zyklus und c) im zweiten Zyklus nach Hysterektomie (Hoffmann *et al.*, 1992).

Luteale Produktion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  konnte bei Wiederkäuern, Ratten und dem Menschen gezeigt werden (Übersicht bei Olofsson & Leung, 1994; Dawood *et al.*, 1997; Fridén *et al.*, 2000; Sakumoto *et al.*, 2000). Stimulierende (Miyamoto *et al.*, 1993) sowie inhibierende (Stocco & Deis, 1998) Effekte des  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wurde bei der Kuh und der Ratte beobachtet werden.

Mittels *in vitro* Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass beim Schwein nach einer anfänglich verstärkten lutealen Sekretion von  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  diese gegen Tag 7 - 14 p.o. der lutealen Phase abnimmt, worauf während der Luteolyse (Tag 15 – 19 p.o.) ein erneuter Anstieg von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgt. Daraus wurde auf eine Beteiligung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  an den zur Luteolyse führenden Mechanismen geschlossen (Patek & Watson, 1983).

Bei der trächtigen Hündin kommt es unmittelbar vor der Geburt zu einem Progesteron-Abfall und gleichzeitig zu einem deutlichen Anstieg von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Abb. 4.4.1c) (Concannon *et al.*, 1988; Nohr *et al.*, 1993). Der präpartale Anstieg von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  resultiert wahrscheinlich aus der Aufregulation der Cox-2-Expression in den fetalen Trophoblastzellen; dabei scheint der präpartale Entzug von Progesteron eine Signalfunktion in der zugrunde liegenden fetomaternalen Zell-zu-Zell-Kommunikation zu spielen (Kowalewski *et al.*, 2010). Diese Beobachtung gibt Hinweise darauf, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  auch beim Hund als endokriner luteolytischer Faktor in Betracht gezogen werden kann (Hoffmann *et al.*, 1996).



**Abb 4.4.1c:** Verlauf von Progesteron ■ und 14-Dihydro-15-ketoprostaglandin F<sub>2</sub>α (PGFM ●) im peripheren Plasma in der späten Trächtigkeit bis zum Ende der Geburt; ▼ erste Zeichen der einsetzenden Geburt (nach Nohr *et al.*, 1993).

Mit unterschiedlichen und repetitiven Dosen (Abhängig vom Trächtigkeitsstadium) von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kann bei der Hündin die Geburt induziert werden (Hubler *et al.*, 1991; Übersicht bei Romagnoli *et al.*, 1991). Ebenso wurde bei zwei Hündinnen beobachtet, dass durch Hemmung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor *Indomethazin* die Geburt um wenige Tage hinausgezögert wird (Hoffmann *et al.*, 1996).

Wie Untersuchungen mit uteroplazentären Einheiten gezeigt haben, verlaufen die physiologische und die induzierte Luteolyse sehr ähnlich (Kowalewski *et al.*, 2009a, 2010). Während der mittleren Trächtigkeit wurde mit *Aglepriston* die Luteolyse induziert. Die Expression von Cox-2, PGF- und PGE-Synthase, PGE- und Progesteron-Rezeptor sind mit

dem Expressionsmuster von Hündinnen während der physiologischen Luteolyse vergleichbar (Kowalewski *et al.*, 2009a, 2010).

#### 4.4.2 Immunsystem

Schon früh wurde über das Vorkommen von Immunzellen, insbesondere Lymphozyten und Makrophagen im CL berichtet (Lobel & Levy, 1968). Bei verschiedenen Tierarten wie Maus, Ratte, Meerschweinchen, Schwein, Schaf und beim Menschen wurde gezeigt, dass die Anzahl an Immunzellen gegen Ende der CL-Phase, sprich Luteolyse, ansteigt (Murdoch *et al.*, 1988; Übersicht bei Brännström & Norman, 1993; Hehnke *et al.*, 1994). Sie spielen eine vielfältige Rolle bei der Funktion des CL. Makrophagen sind zuständig für die Phagozytose von degenerierten Zellen, die Zytokin-vermittelte Hemmung der Steroidogenese und für die Produktion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  im CL (Bulmer, 1964; Adams & Hertig, 1969; Übersicht bei Niswender *et al.*, 2000). Beim Rind konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie der Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) und Interleukin  $1\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ ) für die Luteolyse mitverantwortlich sind (Übersicht bei Pate, 1995; Davis & Rueda, 2002 und Davis *et al.*, 2003).  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  sind in der Lage, die LH-stimulierte Progesteronsynthese zu hemmen (Übersicht bei Pate, 1995). Dies beruht auf zytotoxischen Effekten dieser zwei Faktoren, wie mit bovinen Luteinzellkulturen gezeigt wurde (Petroff *et al.*, 2001).

Beim Schwein kommt  $\text{TNF}\alpha$  eine Rolle als „Umschaltfaktor“ für die luteotrope und luteolytische Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zu (Wuttke *et al.*, 1998). Mittels Mikrodialyse haben Wuttke *et al.* (1998) gezeigt, dass durch die Vorbehandlung mit  $\text{TNF}\alpha$  der die Progesteronproduktion-stimulierende Effekt von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aufgehoben und gleichzeitig die luteolytische Wirkung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  verstärkt wird.

Neben den hemmenden Effekten von Zytokinen auf die Progesteronproduktion wurden auch stimulierende Effekte beschrieben. Beispielsweise wurde in humanen Granulosazellkulturen die Expression von IL-8-mRNA und -Protein nachgewiesen, welches luteotrop wirkt und die Vaskulo- sowie die Angiogenese stimuliert (Arici *et al.*, 1996). Auch wurde die luteotrope Wirkung von IL-10 und IL-4 in kultivierten humanen Lutealzellen nachgewiesen (Hashii *et al.*, 1998).

Auch beim Hund konnte auch eine Beteiligung des Immunsystems an der Regulation der CL-Funktion gezeigt werden (Büsges, 2003; Übersicht bei Hoffmann *et al.*, 2004). So zeigten

Hoffmann et. al. (2004), dass in der frühen und späten Lutealphase die Anzahl CD4-positiver Lymphozyten und MHC II-positiver Zellen in den CL signifikant erhöht war. Ähnlich verhielten sich die CD8-positiven Lymphozyten: ihr Vorkommen war auch zu Beginn der lutealen Phase am höchsten, worauf eine Abnahme an den Tagen 15 und 30 p.o. folgte; ein erneuter Anstieg konnte um den Tag 60 p.o. beobachtet werden, der wieder von einem Abfall gefolgt war (Büsges, 2003).

Mittels qualitativer RT-PCR konnte die Expression weiterer Zytokine im Verlauf des Diöstrus nachgewiesen werden, u.a. von IL- 8, -10 und -12,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF}\beta 1$  (Tumor Growth Factor  $\beta 1$ ). Weiter ergaben sich Hinweise auf die Expression von IL-6 und  $\text{IFN}\gamma$  (Engel *et al.*, 2005).

## 4.5 Plazenta

Beim Hund, wie auch bei anderen Fleischfressern, kommt es zu einer sehr innigen Verbindung zwischen dem fetalen Anteil, dem Chorion und dem maternalen Anteil, dem Endometrium, was teilweisen Gewebeabbau mit sich bringt (Schnorr & Kressin, 2006). Bei der Geburt werden die veränderten Teile der Uterusschleimhaut als *Decidua* (hinfällige Haut; lat. *deciduus*: abfallend) abgestossen. So wird die Plazenta des Hundes als deziduate Plazenta bezeichnet. Bei der Abstossung der *Decidua* entstehen Wundflächen und Blutungen im Endometrium; die Regeneration erfolgt im anschliessenden Puerperium. Ausser dem Hund findet sich diese Art von Plazenta auch bei der Katze, der Ratte, der Maus, dem Meerschweinchen, den Primaten und dem Mensch (Nickel *et al.*, 2004; Schnorr & Kressin, 2006; Noakes *et al.*, 2009).

Histologisch handelt es sich beim Hund wie auch bei der Katze um eine endotheliochoriale Plazenta. Die Einteilung erfolgt nach der trennenden Schicht zwischen maternalem und fetalem Kreislauf (Grosser, 1927; Schnorr & Kressin, 2006; Noakes *et al.*, 2009). Das Uterusepithel wird so weit abgebaut, dass sich die Chorionzotten direkt an das Endothel der mütterlichen Gefässe anlegen. Zwischen den mütterlichen Kapillaren und dem Chorionepithel kommt es zu verstärktem Austausch von Hämotrophen (Schnorr & Kressin, 2006).

Die fetomaternale Kontaktzone ist tierartlich unterschiedlich geformt und wird weitgehend von der Verteilung und Anordnung der chorialen Verzahnungsstruktur bestimmt. Bei der Faltenplazenta wie sie bei Hund, Katze und Schwein vorkommt, greifen Falten und komplexere Lamellen des Chorions in entsprechende Vertiefungen des Endometriums und vergrössern so die Chorionoberfläche (Schnorr & Kressin, 2006). Beim Hund bildet dieses oberflächenvergrösserte Chorion eine Art Gürtel rund um die Fruchtblase, was ihr den Namen Gürtelplazenta (*Placenta zonaria*) gibt (Schnorr & Kressin, 2006; Noakes *et al.*, 2009).

In der Mitte der Trächtigkeit nimmt die Plazenta etwa 25% und, gegen Ende noch 20% der Fruchtblasenoberfläche ein (Schnorr & Kressin, 2006). Seitlich der Plazenta, in der paraplazentären Zone, bilden sich charakteristische Randhämatome, welche durch ihre grüne Farbe (Abbauprodukt des Hämoglobins) auffallen (Noakes *et al.*, 2009). Sie kommen durch die Zerstörung mütterlicher Gefässe zustande und reichen bis in die Uteruskrypten und Drüsentubuli (Barrau *et al.*, 1975; Schnorr & Kressin, 2006).

Während der Präimplantationsphase zeigt die Uterusschleimhaut eine deutliche Hypertrophie und Hyperämie. Die Drüsen sind vergrössert und das Epithel der Krypten wird höher, worauf

in der 3. Woche wieder eine Abflachung der Zellen folgt und sich eine subepitheliale Bindegewebslage bildet (Schnorr & Kressin, 2006). Am 12. bis 13. Tag der Trächtigkeit beginnt der Trophoblast mit der Invasion in das Endometrium (Barrau *et al.*, 1975; Schnorr & Kressin, 2006). Das Uterusepithel wird zunehmend vom Trophoblasten zerstört und aufgelöst. Eine zweite Bindegewebschicht, die Drüsendeckschicht, trennt die tiefen von den oberflächlichen Drüsen. Die oberflächlichen Drüsen erweitern sich zu Drüsenkammern, welche beim Hund besonders weit sind. Ihre vollständige Grösse erreichen sie um den 40. Tag der Trächtigkeit. Oberhalb der Drüsenkammern befindet sich das gut durchblutete Plazentalabyrinth (plazentares Lamellensystem), bestehend aus maternalen und fetalen Anteilen. Die Chorionzotten stehen ab dem 25. Tag in engem Kontakt mit den Drüsenkammern und reichen vom Labyrinth bis in das Lumen der Drüsen (Cupps, 1991; Grether *et al.*, 1998, Schnorr & Kressin, 2006).

Die Implantation besteht beim Hund aus vier nicht immer deutlich voneinander trennbaren Phasen: dem Vorkontakt, der Apposition, der Adhäsion und der Intrusion (Schnorr & Kressin, 2006). Im Vorkontaktstadium sind noch keine morphologischen Assoziationen zwischen Blastozyste und Endometrium erkennbar. Während der Apposition bilden sich punktförmige Kontaktstellen zwischen Trophoblast und Endometrium aus. Die Verbindung ist noch nicht gefestigt und die Blastozyste kann ohne Beschädigung des Endometriums entfernt werden. Der Trophoblast ist in dieser Zeit bereits zum plazentären Stofftransport fähig. In der darauf folgenden Adhäsionsphase wird die Verbindung zwischen fetalem und maternalem Gewebe immer inniger und eine schadlose Trennung der Gewebe ist unmöglich. Als Folge einer weiter verfestigten Verbindung zwischen Trophoblast und Endometrium verschwindet in der Intrusionsphase das Uteruslumen vollständig (Barrau *et al.*, 1975; Schnorr & Kressin, 2006). Da sich die Kontaktaufnahme zwischen embryonalem und maternalem Gewebe über längere Zeit hinzieht, muss der Keim durch Resorption von Uterusflüssigkeit ernährt werden. Dazu dient das als Histiotrophe dienende Symplasma maternum, welches aus den zerfallenen Epithel- und Bindegewebszellen entsteht (Schnorr & Kressin, 2006).

Bei der Bildung der Lamellen und Zotten wird das Chorionepithel zweischichtig: nach aussen zum Uteruslumen hin entsteht durch Verlust der Zellgrenzen der mehrkernige Synzytiotrophoblast; nach innen in Richtung Chorionmesenchym bleiben die Zellen mononukleär und bilden den Zytotrophoblasten (Barrau *et al.*, 1975; Schnorr & Kressin, 2006).

Der eindringende Trophoblast phagozytiert das zerstörte maternale Gewebe und wächst bis ans Kapillarbett vor, um eine enge Verbindung mit den mütterlichen Gefäßen einzugehen (Barrau *et al.*, 1975). Ermöglicht wird dieses Eindringen durch die stark proteolytischen Eigenschaften des Trophoblasten, u.a. die hohe Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (Beceriklisoy *et al.*, 2007).

Beim Hund und bei der Katze kommen im mütterlichen Gewebe des Plazentalabyrinthes Dezidualzellen vor (Anderson, 1969; Übersicht bei Leiser & Kaufmann, 1994). Es handelt sich dabei um aussergewöhnlich grosse endometriale Stromazellen, die typischerweise zwischen dem fetalen und maternalen Teil der Plazenta zu finden sind (Anderson, 1969). Im Gegensatz zur Katze sind die Dezidualzellen beim Hund nur spärlich vertreten (Barrau *et al.*, 1975). Es wurde gezeigt, dass nur Dezidualzellen der Plazenta Progesteron- und Östrogenrezeptoren exprimieren (Vermeirsch *et al.*, 2000; Kowalewski *et al.*, 2010). Progesteronrezeptoren wurden weiter in den glatten Muskelzellen des Myometriums nachgewiesen. Die Dezidualzellen wie auch die glatten Muskelzellen des Myometriums spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit (Vermeirsch *et al.*, 2000).

#### **4.5.1 Synthese und Rolle von Prostaglandinen in der Plazenta**

Wie bereits erwähnt (Kapitel 4.6.1), ist die Geburt an einen präpartalen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Anstieg gebunden (Concannon *et al.*, 1988; Nohr *et al.*, 1993). Zudem kann mittels exogenem  $\text{PGF}_{2\alpha}$  bei der Hündin die Funktion des CL unterbrochen werden kann (Hubler *et al.*, 1991; Übersicht bei Romagnoli *et al.*, 1991). Dies ist jedoch von Nebenwirkungen begleitet, was eine klinische Anwendung einschränkt. Ebenso wurde bereits erwähnt, dass der Geburtszeitpunkt durch die Hemmung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Wirkung um wenige Tage hinausgezögert werden kann (Hoffmann *et al.*, 1996).

Die erste Klonierung der PGF-Synthase cDNA-Sequenz basierte auf mRNA aus der uteroplazentären Einheit von Hündinnen in der späten Trächtigkeit (Kowalewski *et al.*, 2008b). Deshalb wurde vermutet, dass die uteroplazentäre Einheit für den präpartalen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Anstieg verantwortlich sein könnte. Eine ähnliche Situation wurde beim Rind festgestellt, bei dem kurz vor und während der Geburt bis zu 100-fach mehr Cox-2-mRNA in den mononukleären Trophoblastzellen nachgewiesen werden konnte als in jenen von Rindern bis zum Tag 230 der Trächtigkeit (Schuler *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen legen nahe, dass

das plazentäre  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zu den luteolytischen Signalen beim Rind beiträgt. Weiter wurde in derselben Studie gezeigt, dass während der Aufregulation von Cox-2 die Expression von  $20\alpha$ -HSD (das Enzym, das beim Rind die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthase Aktivität besitzt und für die Synthese des luteolytischen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  verantwortlich ist (Madore *et al.*, 2003), nur minimal gesteigert ist. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass beim Rind v.a. Cox-2 die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese kontrolliert (Schuler *et al.*, 2006).

Untersuchungen mit uteroplazentären Einheiten gravider Hündinnen ergaben, dass vor der Implantation die Expression von Cox-2-, PGES- und PGFS-mRNA nur auf einem geringen Niveau beobachtet werden kann. Die zugehörige mRNA der PG-Rezeptoren hingegen wird auf hohem Niveau exprimiert (Kowalewski *et al.*, 2010). Dies spricht für eine starke Empfänglichkeit des Uterus für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$ . Im Verlauf der Plazentabildung bis hin zur präpartalen Luteolyse kann Cox-2 zunehmend in den Trophoblastzellen lokalisiert werden, wo auch PGFS sowie die Rezeptoren für  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  gefunden werden (Kowalewski *et al.*, 2010).

Kowalewski *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die mRNA für alle für die Prostaglandinsynthese benötigten Enzyme in der kaninen Plazenta zu finden sind und dass die dabei entstehenden Metaboliten für eine para/autokrine Funktion sprechen.

Bei trächtigen Schafen konnte nachgewiesen werden, dass  $\text{PGE}_2$  einen positiven Effekt auf die Dehnbarkeit der Zervix besitzt (Stys *et al.*, 1981). Ähnliches wurde bei Untersuchungen beim Menschen beobachtet (Fuchs *et al.*, 1984). Frauen mit ungenügender Zervixöffnung und Indikation zur Geburtseinleitung zeigten einen funktionellen Zusammenhang zwischen  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$ . Wird  $\text{PGE}_2$  endozervikal oder direkt in den Uterus gegeben, kann sich die Zervix öffnen und gleichzeitig steigt der Gehalt an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten im peripheren Blut an (Fuchs *et al.*, 1984).

Durch Studien an Mäusen wird  $\text{PGE}_2$  eine wichtige Rolle in der Dezidualisation durch die erhöhte Proliferation von Stromazellen zugeschrieben (Pakrasi & Jain, 2008). Ferner ergaben sich Hinweise auf einen Einfluss von  $\text{PGE}_2$  via EP2 auf die Differenzierung des Epithels während der Implantation.

#### **4.5.2 Synthese und Rolle von Steroiden in der Plazenta**

Bei vielen Säugetieren produziert die Plazenta Östrogene und Progesteron (Übersicht bei Hoffmann & Schuler, 2002). So konnte beim Rind die lokale Produktion von Östrogen-3-



Sulfat, einem Östrogenderivat, bereits am Tag 33 der Trächtigkeit nachgewiesen werden (Übersicht bei Hoffmann & Schuler, 2002). Im Blut jedoch steigt die Konzentration von plazentären Östrogenen erst zwischen Tag 70 und 100 an. Im Unterschied zu Estradiol-17 $\beta$ , welches im CL produziert wird und biologisch aktiv ist, liegen wenig Informationen zu den plazentären Östrogenderivaten, wie beispielsweise Östron-3-Sulfat vor, die eine viel geringere biologische Aktivität aufweisen. Aufgrund klinischer Beobachtungen wird angenommen, dass beim Rind die plazentären Östrogene erst kurz vor der Geburt biologisch aktiv werden. Dies zeigt sich beispielsweise in der Stimulation der myometrialen Aktivität, Reifung der Plazenta und Erweichung der Geburtswege (Birgel *et al.*, 1996; Übersicht bei Hoffmann & Schuler, 2002).

Beim Rind spielt die plazentäre Progesteronproduktion nur eine kurzfristige und unbedeutende Rolle während der Trächtigkeit; als Hauptquelle für Progesteron gilt das CL (Estergreen *et al.*, 1967; Chew *et al.*, 1979, Johnson *et al.*, 1981). Dies steht im Gegensatz zu Schaf und Pferd, bei denen die Plazenta nach einer Spezies-spezifischen Zeitspanne die Hauptquelle von Progesteron wird (Übersicht bei Hoffmann & Schuler, 2002).

Beim Hund konnte bislang keine Produktion von Steroiden in der Plazenta nachgewiesen werden (Hoffman *et al.*, 1994). Als Untersuchungsmaterial diente dabei kanines Plazentagewebe von den Tagen 25, 53, 60 und 64 der Trächtigkeit. Es konnte kein Anstieg an Estradiol-17 $\beta$  im peripheren Blut gemessen werden; das Estradiol-17 $\beta$  sank vor der Geburt gleichzeitig mit dem Abfall von Progesteron. Daraus schlossen Hoffmann *et al.* (1994), dass es sich bei trächtigen wie auch nicht-trächtigen Hündinnen um Estradiol-17 $\beta$  lutealer Herkunft handelt. In späteren Arbeiten wurde die kanine Plazenta auf das Vorkommen des StAR-Proteins untersucht, dessen Nachweis aber nicht gelang (mündliche Mitteilung M.P. Kowalewski, 2010). Dies bekräftigt die Annahme, dass in der kaninen Plazenta keine Steroidsynthese stattfindet.

Wie bereits erwähnt (Kapitel 4.5.2), sind bei graviden sowie nicht-graviden Hündinnen die CL die einzige Quelle für Progesteron (Übersicht bei Concannon *et al.*, 1989; Nishiyama *et al.*, 1999). Der Rezeptor für Progesteron lässt sich während der gesamten Trächtigkeit nachweisen (Kowalewski *et al.*, 2010). Vor der Implantation kann eine hohe Expression des Progesteronrezeptors in den Uterusepithelzellen, dem endometrialen Stroma und den glatten Muskelzellen des Myometriums beobachtet werden. Die immunhistochemischen Signale des Progesteronrezeptors nehmen im Endometrium im Verlauf der Gravidität deutlich ab und

bleiben nur im Myometrium während der Trächtigkeit nachweisbar (Kowalewski *et al.*, 2010).

#### 4.6 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR)

Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (engl.: *Peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) besteht aus einer Gruppe von nukleären Hormonrezeptoren aus der Steroidrezeptor-Superfamilie. Alle Isoformen (PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  und  $\gamma$ ) werden von unterschiedlichen Genen kodiert (Übersicht bei Berger & Möller, 2002 und Komar, 2005). Entdeckt wurden die PPAR's erstmals in den 90er Jahren, als nach Stoffen gesucht wurde, die bei Nagern eine Proliferation der Peroxisomen in der Leber verursachten (Issemann & Green, 1990), was ihnen auch den Namen gegeben hat. 1992 wurden alle drei PPAR-Isoformen aus der *Xenopus* cDNA-Genbank kloniert (Dreyer *et al.*, 1992).

PPAR's sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Sie regulieren ihre Zielgene, indem sie sich an spezifische Bindungsstellen, den sogenannten *peroxisome proliferator response elements* (PPRE) zusammen mit einem *retinoid X receptor* (RXR) als Heterodimer anlagern. Binden Agonisten an PPAR's, wird die Verbindung stabilisiert und die Transkriptionsrate spezifischer Gene wird gesteigert (Übersicht bei Berger & Möller, 2002). PPAR's sind in vielen lebenswichtigen Prozessen involviert, u.a. der Steroidogenese, der Angiogenese, der Gewebebildung, dem Zellzyklus, der Apoptose und dem Fettstoffwechsel (Übersicht bei Komar, 2005).

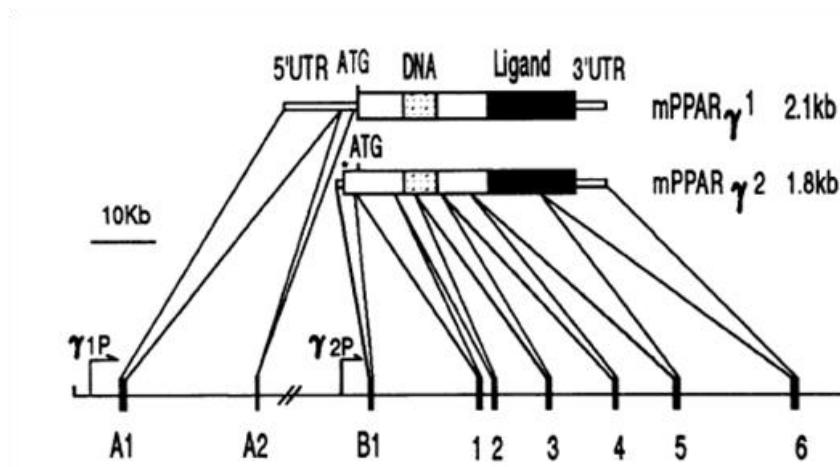
PPAR's setzen sich wie andere nukleäre Rezeptoren aus verschiedenen funktionellen Einheiten zusammen. Die DNA- und die Liganden-Bindungsstelle sind die am höchsten konservierten Strukturen unter allen Isoformen. Im Gegensatz zu anderen nukleären Rezeptoren ist die „Liganden-Bindungsdomäne“ relativ gross, was die enorme Vielfalt an natürlichen und synthetischen Liganden erklären könnte (Tab. 4.8) (Übersicht bei Berger & Möller, 2002). Als endogene Liganden kommen beispielsweise Fettsäuren und deren Derivate wie Eikosanoide und Prostaglandine in Frage. Nicht-steroidale Entzündungshemmer, Thiazolidindione, Herbizide und Fungizide, pflanzliche Inhaltsstoffe, aromatische Kohlenwasserstoffe und Fibrate werden als exogene Liganden genannt (Komar *et. al.*, 2001; Übersicht bei Berger & Möller, 2002). Jede Isoform hat bezüglich der Liganden unterschiedliche Präferenzen: PPAR $\gamma$  bevorzugt vielfach ungesättigte Fettsäuren, PPAR $\alpha$  kann von einer grossen Bandbreite an gesättigten, aber auch ungesättigten Fettsäuren aktiviert werden. Thiazolidindione, Wirkstoffe mit antidiabetischen Effekten, induzieren die Differenzierung und aktivieren spezifische Gene von Adipozyten. Dies geschieht hauptsächlich über die Aktivierung von PPAR $\gamma$ .

**Tab.4.8: Übersicht über endo- und exogene Liganden von PPAR.** Die durch \* gekennzeichneten Liganden sind Stoffe mit nachgewiesener Anwesenheit im Ovar und/oder Effekte auf Zellen des Ovars (nach Komar, 2005).

<b>Endogene Liganden</b>	<b>Quellen</b>	<b>Spezifität für den PPAR-Isotypen</b>
Vielfach ungesättigte Fettsäuren*	Diät, Metabolismus	PPAR $\alpha$ > PPAR $\delta$ >> PPAR $\gamma$
Eicosanoide*	Entzündung	PPAR $\alpha$ > PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$
8-HETE	Metabolismus	PPAR $\alpha$
PGJ <sub>2</sub>		PPAR $\gamma$ >>> PPAR $\alpha$ > PPAR $\delta$
PGA <sub>1</sub>		PPAR $\delta$ >> PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$
PGI <sub>2</sub>		PPAR $\delta$
Leukotrien B <sub>4</sub>		PPAR $\alpha$
Lysophosphatsäure*	Metabolismus	PPAR $\gamma$
Oxidierter LDL	Metabolismus	PPAR $\gamma$
<b>Exogene Liganden</b>	<b>Quellen/ Anwendungen</b>	<b>Spezifität für den PPAR-Isotypen</b>
Herbizide/Fungizide	Umwelt	PPAR $\gamma$
Weichmacher/Plastifizierer*	Umwelt, Industrie	
NSAIDs	Pharmazeutika	PPAR $\gamma$ > PPAR $\alpha$
Fibrate*	Pharmazeutika	PPAR $\alpha$ >>> PPAR $\gamma$
Polyzyklische aromatisierte Kohlenwasserstoffe	Umwelt	PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$
Inhaltstoffe von Kräutern/Pflanzen	Traditionelle Medizin	PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ > PPAR $\delta$
Genistein*	Pflanzen	PPAR $\gamma$
Thiazolidindione*	Pharmazeutika	PPAR $\gamma$

#### 4.6.1 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  wurde nebst *Xenopus* von zahlreichen Spezies inklusive Mensch kloniert (Übersicht bei Green et al., 1995 und Berger & Möller, 2002). Auf Proteinebene gibt es zwei Isoformen von PPAR $\gamma$ . Diese werden von demselben Gen kodiert und entstehen durch alternatives Splicing der RNA (Abb.4.8.1) (Übersicht bei Berger & Möller, 2002).



**Abb. 4.8.1:** Alternatives Splicing von PPAR $\gamma$  (Tontonoz *et al.*, 1994).

Das Vorkommen von PPAR $\gamma$  ist ubiquitär, u.a. in Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskulatur, Darmtrakt, Nieren, Pankreas, Milz und im Reproduktionsgewebe (Komar *et al.*, 2001; Übersicht bei Berger & Möller).

Neben den Effekten im Ovar und in der Plazenta ist PPAR $\gamma$  auch notwendig für die Differenzierung von Adipozyten und reguliert Gene der zellulären Energie-Homöostase (Übersicht bei Berger & Möller, 2002). Ebenso nimmt PPAR $\gamma$  Einfluss auf den Insulin-Metabolismus und demzufolge hat die Gabe von PPAR $\gamma$ -Agonisten eine positive Wirkung bei Typ-2-Diabetikern. Bei Entzündungsprozessen soll PPAR $\gamma$  antiinflammatorisch sein (Übersicht bei Berger & Möller, 2002). Weiterhin inhibiert PPAR $\gamma$  bei diversen Tumorarten die Proliferation und fördert die Differenzierung der Zellen, wobei aber auch berichtet wird, dass PPAR $\gamma$ -Agonisten die Entstehung von Colon-Neoplasien fördern sollen (Übersicht bei Berger & Möller, 2002 und Froment *et al.*, 2006).

#### 4.6.2 PPAR $\gamma$ im Ovar

Im Ovar wurde der Transkriptionsfaktor bei diversen Tierarten wie Ratte, Maus, Schwein, Schaf, Rind und beim Menschen nachgewiesen (Löhrke *et al.*, 1998; Komar *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2002; Schoppee *et al.*, 2002; Übersicht bei Froment *et al.*, 2003). Bei Ratten wird PPAR $\gamma$  vorwiegend in Granulosazellen heranwachsender Follikel exprimiert (Komar *et al.*, 2001). Die steigende Expression von PPAR $\gamma$  während des Follikelwachstums und die anschließende Down-Regulation während des LH-Peaks lassen vermuten, dass PPAR $\gamma$  eine wichtige Rolle bei der Follikulogenese spielt (Komar *et al.*, 2001). In derselben Studie wurde anhand von Zellkulturen gezeigt, dass es bei der Aktivierung von PPAR $\gamma$  zu einer erhöhten Sekretion von Progesteron und Östrogenen kommt. Löhrke *et al.* (1998) erhielten ähnliche Ergebnisse: Bovines Luteingewebe sezerniert mehr Progesteron, wenn es mit Prostaglandin J2 (PGJ2), einem PPAR $\gamma$ -Agonisten, kultiviert wird. Umgekehrt wird weniger Progesteron sezerniert, wenn das Gewebe mit einem PPAR $\gamma$ -Antagonisten behandelt wird (Löhrke *et al.*, 1998). Dies scheint im Widerspruch zu früheren Studien zu stehen, die besagen, PPAR $\gamma$ -Agonisten wie Troglitazon inhibierten die Steroidogenese in kultivierten humanen sowie porzinen Granulosazellen (Gasic *et al.*, 1998; Mu *et al.*, 2000). Dieser Unterschied könnte durch unterschiedliches Differenzierungsstadium der kultivierten Zellen oder tierartliche Variationen entstanden sein (Komar *et al.*, 2001). Weiter könnte dieser Effekt durch den Liganden selbst, also direkt durch Troglitazon, verursacht werden.

Die oben erwähnte Down-Regulation von PPAR $\gamma$  während des LH-Peaks ist möglicherweise mit der erhöhten Aktivität von Cox-2 und der NO-Synthase assoziiert, was wiederum eine erhöhte Syntheserate von Prostaglandinen zur Folge hätte (Übersicht bei Froment *et al.*, 2006). Zusätzlich sind einige Proteasen (Matrix-Metalloproteinase-9, Plasminogen Aktivator und Plasminogen Aktivator-Inhibitor), welche eine wichtige Rolle bei der Ruptur des Follikels und der CL-Bildung spielen, von PPAR $\gamma$  reguliert (Kato *et al.*, 1999; Xin *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2000). PPAR $\gamma$  wird auch eine Rolle in der Angiogenese allgemein und speziell bei der Bildung des CL zugeschrieben. Dies erfolgt vermutlich über die Regulation des Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) (Kap. 4.3.4) (Übersicht bei Froment *et al.*, 2006)

Bei erwachsenen zyklischen Ratten wurde eine höhere Expression von PPAR $\gamma$ -mRNA nachgewiesen als bei juvenilen Ratten, deren Zyklus mit Gonadotropinen angeregt wurde. Dies könnte im Zusammenhang mit der präovulatorischen PRL-Ausschüttung stehen, welche beim Gonadotropin-induzierten Zyklus fehlt (Komar & Curry, 2002). Ebenso konnte ein

Unterschied zwischen normal-zyklischen und pseudograviden Tieren beobachtet werden. In beiden Modellen wurde PPAR $\gamma$ -mRNA reichlich in Granulosazellen von sich bildenden Follikeln nachgewiesen. Im CL von pseudograviden Ratten konnte jedoch im Gegensatz zu normal-zyklischen Ratten nur wenig bis gar keine PPAR $\gamma$ -mRNA gesehen werden (Komar & Curry, 2002). Cui *et al.* (2002) konnten zeigen, dass der Verlust von PPAR $\gamma$  in Oozyten und Granulosazellen bei Mäusen zu reduzierter Fertilität führt. Zwar zeigen diese Tiere eine normale Population an Follikeln, welche ovulieren und CL bilden, aber diese produzieren weniger Progesteron und die Implantationsrate ist kleiner (Cui *et al.*, 2002). Neuere Experimente an Mausmodellen, bei denen gezielt PPAR $\gamma$  in den Granulosazellen ausgeschaltet wurde, ergaben dass PPAR $\gamma$  ein kritischer Faktor bei der Ovulation darstellt (Kim *et al.*, 2008). Die Expression von PR und PPAR $\gamma$  in Granulosazellen präovulatorischer Follikel überlappen sich zeitweise. Es ist denkbar, dass PR die Expression von PPAR $\gamma$  während der Ovulation direkt durch die Interaktion mit der regulatorischen Sequenz der PPAR $\gamma$ -DNA beeinflusst. In der Folge kommt es zu einer reduzierten Ovulationsrate (Kim *et al.*, 2008). Die verschiedenen Ergebnisse beider Studien beruhen vermutlich auf den unterschiedlichen Versuchsanordnungen und den verschiedenen Zelltypen, bei denen PPAR $\gamma$  ausgeschaltet wurde.

Die 4-wöchige Behandlung von Mäusen mit Ciglitazon, einem Thiazolidindion und PPAR $\gamma$ -Agonisten, veränderte nicht die Follikulogenese, steigerte aber die Progesteronsyntheserate (Lebovic *et al.*, 2004). Ähnliches zeigten Experimente mit immortalisierten KK1-Maus-Granulosazellen und MA-10-Leydig-Tumorzellen, welche mit Ciglitazon in Kombination mit Dibutyryl-cAMP behandelt wurden (Kowalewski *et al.*, 2009b). Es wurde eine erhöhte Syntheserate von Progesteron beobachtet und gleichzeitig eine erhöhte StAR-Promotor-Aktivität sowie gesteigerte Expression von StAR-mRNA und StAR-Protein festgestellt. Weiterhin konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei der PPAR $\gamma$ -vermittelten StAR-Regulation um einen indirekten Prozess handelt (Kowalewski *et al.*, 2009b).

#### **4.6.3 PPAR $\gamma$ in der Plazenta**

PPAR $\gamma$  wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Invasion der Trophoblastzellen zugeschrieben. Die Angaben in der Literatur sind teilweise widersprüchlich, jedoch wird immer wieder auf die essentielle Rolle dieses Transkriptionsfaktors verwiesen.

Bei Mäusen führt die Gendeletion des PPAR-Binding-Proteins, ein Koaktivator von PPAR $\gamma$ , zu Plazentainsuffizienz und verminderter plazentären Vaskularisation (Übersicht bei Komar, 2005). Ab Tag 10 der Trächtigkeit kann infolge mangelhafter Ausbildung des Plazentalabyrinthes ein embryonaler Tod festgestellt werden. Es wird PPAR $\gamma$  somit eine wichtige Rolle bei der Trophblastendifferenzierung während der Implantation und der Plazentation zugeschrieben (Barak *et al.*, 1999; Asami-Miyagishi *et al.*, 2004; Übersicht bei Komar, 2005 und Schaiff *et al.*, 2006). Werden bei PPAR $\gamma$ -Null-Embryonen die PPAR $\gamma$ -defizienten Plazentazellen durch Wildtyp-Plazentazellen ausgetauscht, kann dem embryonalen Tod und der Ausdünnung des Myokards vorgebeugt werden (Kubota *et al.*, 1999; Barak *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass PPAR $\gamma$  ein wichtiger Regulator bei der Angiogenese ist, was möglicherweise über das VEGF-System geschieht (Übersicht bei Giaginis *et al.*, 2008).

Auch beim Menschen moduliert PPAR $\gamma$  die Trophoblastinvasion. Die Differenzierung der humanen Plazenta ist charakterisiert durch die Fusion des mononukleären Zytotrophoblasten zum multinukleären Synzytiotrophoblasten. PPAR $\gamma$ -Agonisten wie auch Aktivatoren des RXR beschleunigen diesen Prozess (Schaiff *et al.*, 2000; Tarrade *et al.*, 2001b). Dieser Vorgang der Zelldifferenzierung hat grossen Einfluss auf die zukünftige Funktion der Plazenta, da der Synzytiotrophoblast u.a. weniger anfällig für Hypoxie ist als der Zytotrophoblast (Levy *et al.*, 2000; Crocker *et al.*, 2003). Die Fähigkeit von PPAR $\gamma$  Entzündungen zu unterdrücken, legt die Vermutung nahe, dass auch Uteruskontraktionen, welche mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, inhibiert werden können (Ricote *et al.*, 1998; Übersicht bei Staels, 2005; Pascual *et al.*, 2005,). Während der Schwangerschaft ist die PPAR $\gamma$ -Expression stabil. Beim Einsetzen der Geburt sinkt sie, wohingegen die Cox-2-Expression steigt (Dunn-Albanese *et al.*, 2004).

Anders als bei Mäusen beobachtet, wirkt sich die Anwesenheit von PPAR $\gamma$ -Agonisten wie z.B. LDL und Eicosanoide, negativ auf die humane Trophoblastinvasion aus (Übersicht bei Fournier *et al.*, 2008b). Ebenso wurde gezeigt, dass PGJ<sub>2</sub> und die Thiazolidindione Troglitazon und Rosiglitazon die PPAR $\gamma$ -Aktivität erhöhen, aber nur Troglitazon und Rosiglitazon sich positiv auf die Trophblastendifferenzierung auswirken; PGJ<sub>2</sub> hingegen vermindert dessen Differenzierung (Schaiff *et al.*, 2000; Übersicht bei Fournier *et al.*, 2008a). Offenbar hat nicht nur die agonistische Wirkung gewisser Liganden auf PPAR $\gamma$  einen Einfluss auf die Trophblastendifferenzierung, sondern die Wirkung des Liganden selbst beeinflusst die Plazentation und die Entwicklung der Embryonen. So wird beispielsweise berichtet, dass



hohe Dosen von Rosiglitazon und Pioglitazon sich während der Trächtigkeit bei Ratten toxisch auf die Embryonen auswirken und die Geburt hinauszögern (Übersicht bei Schaiff *et al.*, 2006 und Giaginis *et al.*, 2008).

PPAR $\gamma$  oder besser gesagt seine Liganden werden beim Menschen immer wieder in Zusammenhang mit Pathologien des Trophoblasten, insbesondere dem Chorionkarzinom, gebracht (Capparuccia *et al.*, 2002). In humanen Plazenten wurde im ersten Trimester der Schwangerschaft weniger PPAR $\gamma$  nachgewiesen als in Plazenten, die von Fehlgeburten stammen (Toth *et al.*, 2009). Die Invasion des Trophoblasten scheint durch PPAR $\gamma$  dosisabhängig reguliert zu sein: Stimulation des PPAR $\gamma$ -Rezeptors bewirkt eine reduzierte, Blockierung hingegen eine vermehrte Invasion (Tarrade *et al.*, 2001a, b, c; Toth *et al.*, 2009). Während einer normalen Schwangerschaft sind PPAR $\gamma$ -Aktivatoren erhöht, jedoch signifikant erniedrigt, wenn es im Verlauf der Schwangerschaft zu Präeklampsie kommt (Waite *et al.*, 2000).



## 5 Ziel der Arbeit

Bisher existieren noch keine Untersuchungen zur Lokalisation und zum Expressionsmuster von PPAR $\gamma$  im CL und der uteroplazentären Einheit der Hündin durchgeführt. Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- 1) die Lokalisation von PPAR $\gamma$  im CL und in der uteroplazentären Einheit der Hündin
- 2) die Darstellung des Expressionsmuster dieses Transkriptionsfaktors im Verlauf der Trächtigkeit sowie
- 3) mögliche Regulationsmechanismen bei der Geburt im Vergleich zu einem *Aglepriston*-induzierten Abort zu untersuchen und zu dokumentieren.

So sollten weitere Einblicke in die Regulation der kaninen Reproduktion erlangt werden.



## 6 Material und Methoden

### 6.1 Probematerial

Alle durchgeführten Versuche mit Hunden wurden von den entsprechenden Stellen genehmigt [Versuchsgenehmigung Nr. II 25.3-19c20-15c GI 18/14 und VG3-19c20/15c GI 18,14 (Justus-Liebig-Universität Giessen)] sowie Versuchsgenehmigung [Ankara 2006/06 (Tiermedizinische Fakultät der Universität Ankara)].

#### 6.1.1 Normale Trächtigkeit

Es wurden 4 Gruppen mit jeweils 3 - 5 klinisch gesunden, trächtigen Hündinnen unterschiedlicher Rassen gebildet. Das Alter der Hündinnen variierte zwischen 2 und 8 Jahren.

Um den Zeitpunkt der Ovulation zu bestimmen, wurden ab Beginn der Läufigkeit alle 1 - 2 Tage Blutproben gewonnen und der Plasmaprogesteronspiegel bestimmt. Es wurden dabei bereits beschriebene Methoden angewandt (Hoffmann *et al.*, 1973). Die Hündinnen wurden zu definiertem Zeitpunkt nach der Ovulation ovariohysterektomiert:

Gruppe 1:	Präimplantation, Tag 8 - 12	n=5
Gruppe 2:	Postimplantation, Tag 18 - 25	n=5
Gruppe 3:	mittlere Trächtigkeit, Tag 35 - 40	n=5
Gruppe 4:	präpartale Luteolyse	n=3

In der Gruppe 4 wurde ab dem 58. Tag in einem 6-Stunden-Intervall der Progesteronspiegel bestimmt. Ergaben zwei nachfolgende Messungen einen Wert  $< 3$  ng/l, wurde die OHE durchgeführt (Kowalewski *et al.*, 2009a).

CL sowie uteroplazentäre Einheiten wurden nach der Entnahme vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Für die RNA-Konservierung wurde ein Teil der Proben über Nacht bei 4 °C in RNAlater® (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden, DE) fixiert und bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung bzw. Proteinisolierung aufbewahrt. Die Proben für die Immunhistochemie (IHC) wurden in 4% gepuffertem (pH 7.0) Formaldehyd für 24 Stunden fixiert. Anschliessend wurde das Gewebe mit 0,1M Phosphatpuffer (pH 7.2) mehrmals

gespült. Danach wurde das Gewebe über jeweils 24 Stunden in 30-, 50- und 70% Alkohol dehydriert und in Paraffin eingebettet.

### **6.1.2 Induzierter Abort**

10 Hündinnen mit nachgewiesener Trächtigkeit, wie beschrieben bei Kowalewski *et al.*, 2010, wurden mit dem Antiprogestin *Aglepriston* behandelt. Die Behandlung erfolgte am 40. - 45. Tag der Trächtigkeit, wobei die empfohlene Dosierung für die Abortinduktion verwendet wurde (10mg/kg KGW zweimal im Abstand von 24 Stunden). Die OHE wurde 24 Stunden (n=5) und 72 Stunden (n=5) nach der 2. Injektion durchgeführt.

Die entnommenen Proben wurden analog zu jenen der Hunde aus der Gruppe drei und vier weiterverarbeitet.

## 6.2 Immunhistochemie

Von jeder der ausgewählten Proben wurden jeweils 2 aufeinanderfolgende, 3µm dicke Paraffinschnitte mit dem Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica Microsystems, Nussloch, DE) angefertigt. Die Schnitte wurden anschliessend auf Adhäsions-Objektträger (SuperFrost Plus®, Menzelgläser, Braunschweig, DE) aufgezogen und zum Trocknen bei 37 °C über Nacht in den Wärmeschrank (Binder, Binder GmbH, Tuttlingen, DE) gestellt. Der eine Schnitt wurde zum Nachweis von PPAR $\gamma$ , der andere für den Vimentinantikörper gebraucht.

Für den immunhistochemischen Nachweis von PPAR $\gamma$  wurde die indirekte Methode gewählt. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler IgG-Antikörper (PPAR $\gamma$  81B8 Rabbit mAb, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) verwendet. Der PPAR $\gamma$ -Antikörper wurde jeweils 1:25 verdünnt.

Beim sekundären Antikörper für den PPAR $\gamma$ -Nachweis handelte es sich um einen gegen Kaninchen-IgG gerichteten biotinylierten Antikörper aus der Ziege (BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, USA). Verwendet wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:100.

Um eine sichere Differenzierung der Zellen in der fetomaternalen Einheit zu gewährleisten, wurde ein monoklonaler, aus der Maus stammender Antikörper gegen Vimentin (Clone Vim 3B4, DakoCytomation, Glostrup, Dk) verwendet, welcher in einer Verdünnung von 1:100 angewendet wurde. Dieser Antikörper markiert vornehmlich Zellen mesenchymalen Ursprungs, d.h. Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen sowie Endothelzellen der Blutgefässe.

Als sekundärer Antikörper für den Nachweis von Vimentin wurde ein gegen Maus-IgG gerichteter biotinylierter Antikörper aus der Ziege (BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet.

Für die Negativkontrolle wurden Schnitte von allen Gewebeproben ohne Primärantikörper bearbeitet, dies um auszuschliessen, dass der Sekundärantikörper unspezifisch bindet und somit zu falsch positiven Ergebnissen führt.

Als sogenannte Isotypenkontrolle wurde eine nicht-immunisierte Kaninchen-IgG-Fraktion (Normal Rabbit IgG, Cell Signaling Technology Inc., Technology Inc., Danvers, USA) eingesetzt; als sekundärer Antikörper dazu wurde derselbe gegen Kaninchen-IgG gerichtete biotinylierte Antikörper aus der Ziege gebraucht (BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame,

USA). Verwendet wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:25, der sekundäre Antikörper 1:100.

### **6.2.1 Vorgehen**

Genaue Angaben zum Vorgehen und den verwendeten Lösungen können der Tabelle 6.2.1 und dem Kapitel 11.1 „Puffer und Lösungen“ entnommen werden.

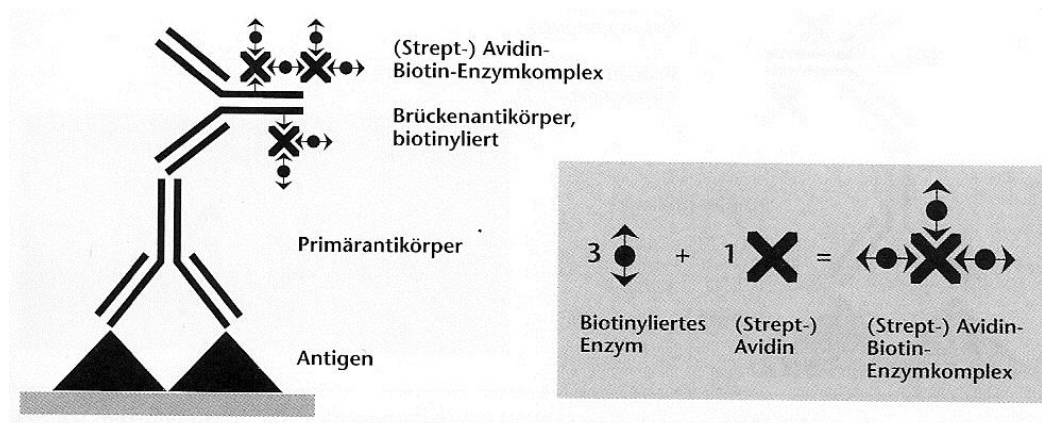
Die Schnitte wurden für die Entparaffinierung zuerst im Xylol, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100-, 96-, 70%) eingetaucht und anschliessend unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Gewebeschnitte zunächst bei Raumtemperatur und danach in der Mikrowelle im Citratpuffer (pH 6,0) behandelt. Die Proben wurden im Citratpuffer wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschliessend erneut unter fließendem Leitungswasser gespült. Um endogene Peroxidase-Aktivitäten in den Proben zu unterdrücken, wurden die Präparate in 0,3% Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch verbracht und bei Raumtemperatur für 30 min geschüttelt.

Im Anschluss wurden die Objektträger kurz mit 3% IHC-Puffer/0,3% Triton gespült und auf Coverplates (Shandon Coverplates<sup>TM</sup>, Cheshire, UK) verbracht. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde Normalserum, hier 10% Normal Goat Serum (KPL, Maryland, USA) auf die PPAR $\gamma$ - und Vimentin-Proben aufgetropft und für 30 min inkubiert. Anschliessend wurde der Primärantikörper auf jeden Schnitt aufgetragen und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte vier Mal 5 min mit IHC-Puffer/0,3% Triton gespült. Anschliessend wurde der Sekundärantikörper auf jede Probe aufgetragen und 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Wiederum folgte zwei mal 5 min Spülen mit IHC-Puffer/0,3% Triton.

Als Visualisierungssystem wurde das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. ABC steht für Avidin-Biotin-Complex. Das Avidin hat vier Bindungsstellen, wovon jeweils drei einen makromolekularen Komplex eingehen. Die noch freie Bindungsstelle koppelt sich ans Biotin des Sekundärantikörpers, des sogenannten Brückenantikörpers. Biotin besitzt eine sehr starke Bindungskapazität und Affinität zum niedermolekularen Avidin. Dadurch weist dieses Verfahren eine sehr hohe Sensitivität auf (Abb. 6.2.1).





**Abb. 6.2.1:** Prinzip des ABC-Systems (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000).

Mit dem Chromogen DAB (Liquid DAB+Substrate, Dako, Baar, CH) wurde die Immunoreaktion anschliessend sichtbar gemacht.

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica, DMLB®, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH) begutachtet. Alle immunhistochemischen Bilder wurden mit einer computerisierten Digitalkamera (Colorview 12, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH) und mit Hilfe der Software analySIS Pro® (Version 5.0, Soft Imaging System GmbH) aufgenommen.

**Tab. 6.2.1:** Immunhistochemisches Arbeitsprotokoll:

<b>Tag 1:</b>
Xylol 2 x 10 min
Absteigende Alkoholreihe (100-, 96-, 70%) je 2 x 2 min
5 min unter fliessendem Leitungswasser spülen
5 min Citratpuffer (Gebrauchslösung) bei Raumtemperatur
3 x 5 min im vorgeheizten Citratpuffer (pH 6,0), Mikrowelle bei 560 W, jeweils verdunstete Flüssigkeit mit Aqua dest. auffüllen
20 min Proben im Citratpuffer abkühlen
5 min unter fliessendem Leitungswasser spülen
30 min in 0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol, bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
1 x 5 min mit 0,3% Triton-IHC-Puffer spülen
Objektträger auf Coverplates bringen

1 x 5 min mit 0,3% Triton-IHC-Puffer spülen
30 min Proteinblock mit Normal Goat Serum 10% für PPAR $\gamma$ - sowie Vimentin-AK
Primärantikörper, je 100 $\mu$ l/Schnitt Verdünnung: PPAR $\gamma$ 1:25, Vimentin 1:100 Über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C inkubieren

<b>2. Tag:</b>
4 x 5 min mit 0,3% Triton-IHC-Puffer spülen
Sekundärantikörper, 60 min bei Raumtemperatur inkubieren Verdünnung: 1:100 für PPAR $\gamma$ : anti-rabbit für Vimentin: anti-mouse
2 x 5 min mit 0,3% Triton-IHC-Puffer spülen
30 min ABC Kit nach Vorschrift inkubieren
1 x 5 min mit 0,3% Triton-IHC-Puffer spülen
Objektträger von Coverplates herunter nehmen
Proben mit DAB-Lösung nach Vorschrift inkubieren PPAR $\gamma$ : ca. 20 min Vimentin: ca. 3 min
10 min unter fließendem Leitungswasser spülen
Gegenfärbung mit Hämalun, 1:1 verdünnt
5 min unter fließendem Leitungswasser spülen
Aufsteigende Alkoholreihe (70-, 96-, 100%) je 2 x 2 min
2 x 5 min Xylol
Eindecken der Objektträger mit Kunstharz (Pertex®)

### **6.3 Western Blot**

Genaue Angaben zum Vorgehen und den verwendeten Lösungen können der Tabelle 6.3.2b und dem Kapitel 11.1 „Puffer und Lösungen“ entnommen werden

#### **6.3.1 Proteinisolierung**

Die Corpus luteum- und Uterus/Plazenta-Komplex-Proben von den Hündinnen mit normaler Trächtigkeit wurden in RNAlater fixiert und bei -80 °C eingefroren und so haltbar gemacht. Zur Proteinsolierung wurden kleine Gewebestücke mit einem Handhomogenisator zusammen mit einer Working-solution aus Net-2-Puffer und Proteinase-Inhibitor (10 µl/ml Puffer) (Sigma-Aldrich<sup>TM</sup> Chemie GmbH, Buchs, CH) zerkleinert. Das Homogenisat wurde 10 min bei 10'000 x g bei 4 °C zentrifugiert und anschliessend der Überstand zur weiteren Verwendung abpipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradfordmethode (Bradford Quick Start, BioRad, Reinach, CH) mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (Smart Spec<sup>TM</sup> Plus, BioRad, Reinach, CH) bei 595 nm gemessen. Verwendet wurden dazu Einwegküvetten (Semimicrovolume cuvette, quartz, BioRad, Reinach, CH). Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

#### **6.3.2 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), Transfer und Detektion**

Die Proben wurden mit Net-2-Puffer und 4-fachem Sample-Puffer auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt und bei 95 °C über 10 min erhitzt. Mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine anschliessend auf einem 8% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Zusammensetzung für das Polyacrylamid-Gel ist in der Tabelle 6.3.2a ersichtlich.

**Tabelle 6.3.2a:** Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels. Die Menge ist ausreichend für zwei Gele:

<i><b>Sammelgel 5%</b></i>	<b>Menge (µl)</b>	<i><b>Trenngel 8%</b></i>	<b>Menge (µl)</b>
40% Polyacrylamid	625	40% Polyacrylamid	2400
Upper Tris Puffer mit SDS	675	Lower Tris Puffer mit SDS	3120
TEMED	5	TEMED	7
10% Ammoniumpersulfat	50	10% Ammoniumpersulfat	120
Aqua dest.	3650	Aqua dest.	6360
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>5000</b>		<b>12000</b>

Mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems (Criterion Blotter, BioRad, Basel, CH) wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (Immuno-Blot PVDF Membran, BioRad, Basel, CH) übertragen (geblottet). Dieser Vorgang erfolgte bei 100V und dauerte 60 min.

Um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde sie in einer Blocking-Solution (PBS/0,25% Tween + 5% Milchpulver) geschwenkt. Anschliessend wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert. Als Primärantikörper wurde derselbe Antikörper wie für die Immunhistochemie verwendet. Der Antikörper wurde jeweils 1:1000 mit PBS/0,25% Tween + 2,5% Milchpulver verdünnt.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal 10 min mit PBS/0,25% Tween gewaschen um anschliessend den Sekundärantikörper aufzutragen. Dieser wurde 60 min inkubiert. Beim hier verwendeten Sekundärantikörper handelte es sich um einen gegen Kaninchen-IgG gerichteten, mit HRP- (Horse radish peroxidase) konjugierten Antikörper aus der Ziege (Promega, Dübendorf, CH). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:15'000 eingesetzt. Um überschüssigen Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran anschliessend erneut 5 Mal für 10 min mit PBS/0,25% Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Kit (Immun Star® Chemiluminescent Kit, BioRad, Basel, CH) oder mit dem SuperSignal®-West-Femto-Maximum-Sensitivity-Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA), um schwächere Signale sichtbar zu machen. Entwickelt wurden die Membranen mit einem LAS-3000-Gerät (Fujifilm).

Nach der Auswertung wurde die Membran mit Glycin (pH 2,6) während 60 min gestrippt, um anschliessend die Expression des *House-keeping genes* GAPDH auf derselben Membran

darzustellen. Dies ermöglichte anschliessend die semi-quantitative Auswertung der Expression von PPAR $\gamma$ .

**Tabelle 6.3.2b:** Arbeitsprotokoll Western Blot

<b>Tag 1:</b>
<b>Gelelektrophorese:</b>
Proben mit Net-2-Puffer und 4-fachem Sample-Puffer ansetzen
Proben 10 min bei 95 °C erhitzen
Proben auf Acrylamid-Gel pipettieren
Gel im Running-Puffer bei 80 V laufen lassen, bis sich Proben gleichmässig im 5% Sammelgel gesammelt haben, anschliessend auf 100 V hochstellen und weiterlaufen lassen, bis der Marker ganz am unteren Ende des 8% Trenngels angekommen ist
<b>Transfer</b>
Blot-Aufbau mit Tank-Blot-System
Blotten im Transfer-Puffer bei 100 V für 60 min, bei Raumtemperatur
Blotabbau
60 min blockieren der Membran in Blocking-Solution (PBS/0,25%Tween + 5% Milchpulver), auf Schüttler bei Raumtemperatur
Inkubation Primärantikörper (PPAR $\gamma$ -Antikörper), Verdünnung 1:1'000, 20 min auf Schüttler bei Raumtemperatur, anschliessend über Nacht bei +4 °C
<b>2. Tag:</b>
3 x 10 min waschen der Membran mit PBS/0,25% Tween
Sekundärantikörper (anti-rabbit-IgG), 60 min inkubieren auf Schüttler Verdünnung 1:15'000
5 x 10 min waschen der Membran mit PBS/0,25% Tween
<b>Detektion</b>
5 min mit Immun Star® Chemiluminescent Kit oder SuperSignal®-West-Femto-Maximum-Sensitivity-Substrate inkubieren

Entwicklung der Membranen mit LAS-3000 (Fujifilm)
---

<b>Strippen</b>
60 min waschen der Membran mit 0,1 M Glycin (pH 2,6) auf Schüttler
5 min spülen der Membran mit Aqua dest. und PBS/0,25% Tween auf Schüttler
60 min blockieren der Membran in Blocking-Solution (PBS/0,25% Tween + 5% Milchpulver), auf Schüttler bei Raumtemperatur
Inkubation Primärantikörper (GAPDH-Antikörper), Verdünnung 1:10'000, 20 min auf Schüttler bei Raumtemperatur, anschliessend über Nacht bei +4 °C

<b>3.Tag</b>
3 x 10 min waschen der Membran mit PBS/0,25% Tween
Sekundärantikörper (anti-mouse-IgG), 60 min inkubieren auf Schüttler Verdünnung 1:20'000
5 x 10 min waschen der Membran mit PBS/0,25% Tween

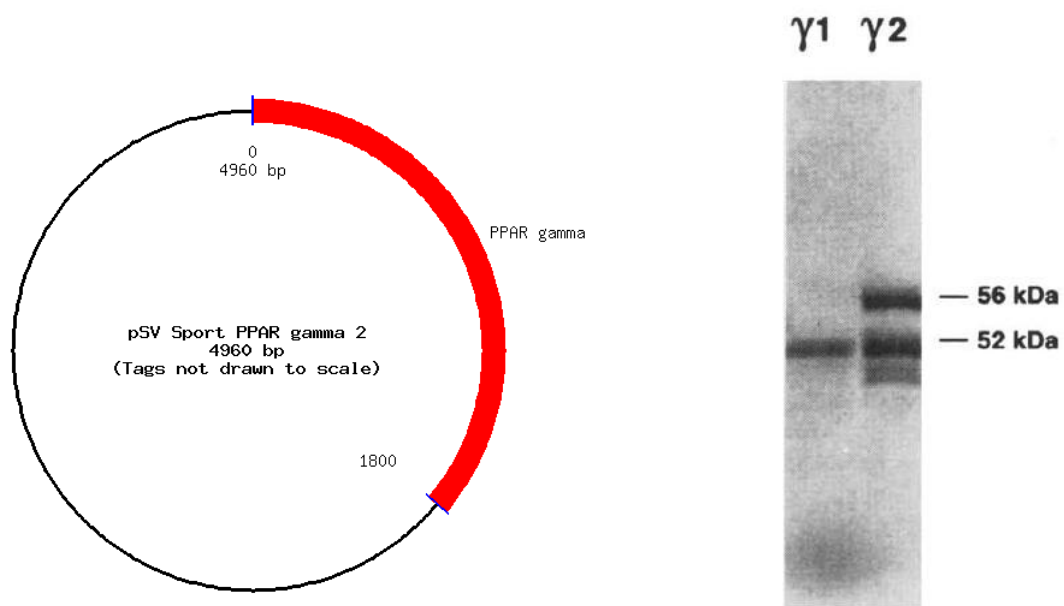
<b>Detektion</b>
5 min mit Immun Star® Chemiluminescent Kit inkubieren
Entwicklung der Membranen mit LAS-3000 (Fujifilm)

### 6.3.3 *In vitro* Transkription von pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmid

Als Kontrolle für den Western Blot wurde das Plasmid pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2 (Abb. 6.3.3) (Addgene, Cambridge, MA, USA; Tonotoz *et al.* 1994) verwendet. Dieser Vektor, welcher die zwei Isoformen PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2 exprimiert, wurde in *E. coli*-Bakterien (XL-1 blue) transformiert und kultiviert. Anschliessend wurde das Plasmid pSV Sport PPAR $\gamma$  mit dem PureYield™ Plasmid Maxiprep System Kit (Promega, Dübendorf, CH) aufgereinigt.

Das Protein PPAR $\gamma$  wurde mit dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Dübendorf, CH) exprimiert. Die so erhaltenen Kontrollprodukte PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2 wurden wie die Proben weiterverarbeitet.

Es wurde jeweils in Anlehnung an die vom Hersteller mitgelieferten Protokolle gearbeitet.



**Abb. 6.3.3:** *links:* Das Plasmid pSV Sport PPAR $\gamma$ ; *rechts:* Darstellung des pSV Sport PPAR $\gamma$ -Proteins mittels Western Blot (Tontonoz *et al.*, 1994)..

#### 6.3.4 Auswertung

Die auf der Membran erhaltenen Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet und mit dem Programm ImageJ 1.38 x (Wayne Rasband, NIH, USA) den SOD-Wert (Standardised Optical Density) berechnet, bezogen auf die jeweilige Expression von GAPDH.

## 6.4 Qualitative RT-PCR

### 6.4.1 RNA-Isolierung

Die Gewebestücke von CL und Uterus/Plazenta-Komplexen wurden bei -80 °C bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Geschützt in einer Alufolie wurden die Proben mit einem sauberen Hammer zerkleinert. Anschliessend wurden die Gewebestückchen in einen sterilen, vorgekühlten Mörser überführt und in flüssigem Stickstoff mit dem Pistill weiter zerkleinert. Das so erhaltene Pulver wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsröhrchen überführt, in dem 1 ml Trizol® (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) vorgelegt wurde. Die Homogenisierung erfolgte mittels eines Ultraturrax (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, CH). Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Nach 10 min auf Eis wurde dem Homogenisat 200 µl Chloroform (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH) zugegeben, geschüttelt und erneut 5 min auf Eis stehen gelassen. Anschliessend erfolgte das Zentrifugieren der Proben bei +4 °C, 18'700 x g, 20 min lang. Von den 3 Phasen, die sich gebildet haben, wurde die oberste wässrige, RNA-haltige abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen übertragen. Erneut wurde die Probe mit Chloroform bearbeitet. Wieder wurde die obere, RNA-haltige Phase in ein sauberes Röhrchen gegeben. Zur Fällung der RNA wurde die Probe zu etwa gleichen Volumenanteilen mit Isopropanol versetzt, geschüttelt und für 30 min bei -20 °C kalt gestellt. Anschliessend wurde die Probe nochmals geschüttelt und bei +4 °C mit 18'700 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Probe 500 µl 70% Ethanol zugegeben. Anschliessend wurde das Röhrchen erneut bei +4 °C und 18'700 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Zum Schluss wurde das Pellet mit 50 µl sterilem doppelt destilliertem Wasser versetzt und bei 50 °C 10 min auf dem Thermomixer inkubiert. Anschliessend wurde 1 µl RNase-Inhibitor (Riboloc RNase Inhibitor, 40 U/µl, Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH) zugegeben, um die RNA vor dem Abbau zu schützen.

Die Dichtebestimmung erfolgte photometrisch mit einem UV-Spektrometer (SmartSpec™ Plus, BioRad, Reinach, CH) und trUView Cuvettes (BioRad, Reinach, CH) bei 260 nm. Anhand der gemessenen Konzentration wurden aus allen Proben mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 100 ng RNA/µl eingestellt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die unverdünnten Stammlösungen wurden bei -80 °C gelagert.



### 6.4.2 DNase-Behandlung

Um eine Amplifikation eventuell in der Probe vorhandener genomischer DNA zu verhindern, wurde vor jeder RT-PCR die gewonnene totale RNA mit DNase behandelt. Der DNase-Mix wurde unter Kühlung auf Eis in 0,5 ml Kunststoffreaktionsröhrchen (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) gemäss Tab. 6.4.2 hergestellt. Die DNase I, RNase-free und DNase-Puffer stammen von Roche Molecular Biochemicals, Basel, CH; der RNase-Inhibitor von MBI Fermentas, Le Mont-sur Lausanne, CH.

**Tab. 6.4.2:** Zusammensetzung des DNase-Mixes für die DNase-Behandlung

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
DNase Puffer	2	5 x
DNase I, RNase frei	1	10 U/µl
RNase-Inhibitor	0,25	40 U/µl
Gesamtvolumen	3,25	

Zum DNase-Mix wurden 6,65 µl der RNA-Arbeitsverdünnung gegeben, damit ein Endvolumen von 9,90 µl erhalten wurde. Jeder Arbeitsschritt erfolgte gekühlt auf Eis.

Die DNase-Behandlung wurde in einem Mastercycler gradient (Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Phase 1: 10 min bei 37 °C
- Phase 2: 5 min bei 75 °C (Deaktivierung der DNase)
- Phase 3: abkühlen auf 4 °C

Die Stabilität der RNA ist nach der DNase-Behandlung nur sehr kurze Zeit gewährleistet. Aus diesem Grund wurde die Reverse Transkription (RT) direkt im Anschluss durchgeführt.

### 6.4.3 Reverse Transkription (RT)

Um aus der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA cDNA zu synthetisieren, wurde das GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) verwendet. Das Vorgehen entsprach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Unspezifisch bindende Primer, sogenannte *Random Hexamers*, wurden als Startprimer eingesetzt.

Der RT-Mastermix wurde gemäss Tabelle 6.4.3 zusammenpipettiert. Pro Ansatz wurde 1,5 µl der DNase-behandelten RNA-Lösung zugegeben. Alle Pipettierschritte erfolgen gekühlt auf Eis.

**Tab. 6.4.3:** Zusammensetzung des RT-Mastermixes für die Reverse Transkription

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
H <sub>2</sub> O	2	
MgCl <sub>2</sub>	2	25 mM
PCR-Puffer	1	10 x
dNTP-Mix <sup>1)</sup>	2	10 mM
Random Hexamers	0,5	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5	50U/µl
Gesamtvolumen	8,5	

<sup>1)</sup> Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix

Die Behandlung der Proben im Mastercycler gradient (Vaudaux-Eppendorf, Basel, CH) erfolgte nach folgendem Programm:

- Phase 1: 8 min bei 21 °C
- Phase 2: 15 min bei 42 °C
- Phase 3: 5 min bei 99 °C
- Phase 4: abkühlen auf 4 °C

Die synthetisierte cDNA ist stabil und kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt werden.

## **6.5 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR**

Die Real Time PCR (Polymerase Ketten Reaktion) stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar. Es kann das Expressionsniveau der RNA in einer Probe bestimmt werden, weswegen das Verfahren auch „quantitative PCR“ genannt wird.

Wie bei der konventionellen PCR muss die mRNA vor der eigentlichen PCR in geeignete cDNA (Template) umgeschrieben werden. Dies erfolgt mittels Reverser Transkriptase (RT). Siehe dazu die in Kap. 6.4.2 und 6.4.3 beschriebenen Protokolle.

Die Bestimmung der Expression von PPAR $\gamma$  (Zielgen) wurde mit dem TaqMan Sonden-Verfahren durchgeführt.

### **6.5.1 TaqMan PCR-Prinzip**

Das Prinzip beruht auf der Verwendung einer TaqMan-Sonde. Dabei handelt es sich um ein kurzes Oligonukleotid, das als Gensonde spezifisch an die PCR-Matrize bindet. Die TaqMan-Sonde ist am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (F) „6-FAM“ markiert und am 3' Ende befindet sich eine Fluoreszenz-löschende Verbindung, ein sogenannter Quencher (Q), „TAMRA“. Durch die räumliche Nähe unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Markers. Die Taq-Polymerase verlängert – ausgehend von spezifisch gebundenen Primern – die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA. Dabei stösst die Polymerase auf die spezifisch gebundene TaqMan-Sonde, welche aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität abgebaut wird. Durch die so herbeigeführte räumliche Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher kommt es zu einem Fluoreszenzsignal, welches direkt mit der Zunahme der PCR-Produkte korreliert.

Die Taq-Polymerase kann ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität nur an einem DNA-Doppelstrang entfalten. Daher können die freien, nicht hybridisierten Sondenmoleküle nicht abgebaut werden und zeigen kein Fluoreszenzsignal.

### **6.5.2 Durchführung der Real Time PCR**

Bei der Durchführung der Real Time PCR wurde der FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche, Basel, CH) MasterMix verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Real Time PCR ist in Tabelle 6.5.2a dargestellt. Zu 20  $\mu$ l

Reaktionsansatz wurden jeweils 5 µl cDNA-Lösung aus dem RT-Ansatz pipettiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

**Tabelle 6.5.2a:** Real Time RT-PCR-Reaktionsansatz

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
Master Mix	12,5	2 x
Sense-Primer	1,5	5 µM
Antisense-Primer	1,5	5 µM
TaqMan-Sonde	1,0	5 µM
Steriles bidest. Wasser	3,5	
Gesamtvolumen	20,0	

In Tabelle 6.5.2b sind die Basensequenzen der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden zu finden, welche mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewählt wurden. Die Sonden sowie die Primer wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, B) synthetisiert.

**Tab. 6.5.2b:** Basensequenzen der verwendeten Primer.

Primer	Accession-Nr. (Genbank)	Basensequenzen	Produkt- länge
GAPDH-for GAPDH-rev	AB028142	5'-GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A-3' 5'-GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG-3'	75 bp
GAPDH- TaqMan-Sonde	AB028142	5'-TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT-3'	
PPAR $\gamma$ -for PPAR $\gamma$ -rev	NM_001024632	5'-GGC CCT GGC AAA ACA TTT G-3' 5'-TCG CTC TCG CCT TTG CTT T-3'	71 bp
PPAR $\gamma$ - TaqMan-Sonde	NM_001024632	5'-ATG ACT CAT ACA TAA AGT CCT TCC CGC-3'	

Die Real Time Reaktionen erfolgten in einem 7500 Fast Real Time PCR System unter Verwendung von 96-well optical plates (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH). Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Phase 1:	Initiale Denaturierung	
	10 min bei 95 °C	
Phase 2:	Denaturierung	} 40 Wiederholungen
	15 sek bei 95 °C	
Phase 3:	Annealing = $T_A$ und Verlängerung	
	1 min bei 60 °C	

### 6.5.3 Auswertung

Die durch Real Time PCR ermittelte Quantifizierung der Expression eines Gens kann man in eine absolute sowie eine relative Quantifizierung unterteilen. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Anzahl der Kopien eines Gens, was der absoluten Menge entspricht, ermittelt. Dazu wird zur Erstellung einer Regressionsgeraden ein genauer Standard benötigt, beispielsweise eine definierte Menge von Plasmid-DNA des entsprechenden Gens.

Bei der relativen Quantifizierung wird der Anstieg bzw. Abfall des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Das *House-keeping Gene*, das zur Normierung der Daten verwendet wird, sollte nicht reguliert werden, d.h. es sollte ein konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen besitzen. Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR eine vergleichbare Reaktionseffizienz zeigen.

In dieser Arbeit kam die relative Quantifizierung unter Verwendung des *House-keeping Genes* GAPDH als Referenzgen zum Einsatz.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, auch Threshold Cycle oder  $C_T$ -Wert genannt. Der  $C_T$ -Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Dabei gilt, dass zu Beginn der PCR-Reaktion nur die Hintergrund- oder Basisfluoreszenz gemessen wird. Dies ist möglich, da die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Somit definiert der  $C_T$ -Wert den Zeitpunkt, ab dem die Amplifikation und damit die Bildung von

Doppelstrang cDNA exponentiell ist und in dieser Phase die PCR-Reaktion von keinen limitierenden Faktoren wie Primer-, Nukleotidmangel oder nachlassender Enzymaktivität eingeschränkt wird.

Der  $C_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten Kopienzahl der cDNA des entsprechenden Gens. Je mehr cDNA-Templates zu Beginn vorhanden sind, desto geringer ist die erforderliche Anzahl an Zyklen, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen. Mit der Formel 1 berechnet man den Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen. Dabei wird auf das *House-keeping Gene* GAPDH normalisiert.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH}} \quad (1)$$

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss zunächst der  $\Delta\Delta C_T$  bestimmt werden. Dafür wird ein Kalibrator ausgewählt. Als Kalibrator wird die Probe bezeichnet, bei der die Expression am niedrigsten war, sprich die Probe mit dem höchsten  $\Delta C_T$ . Der  $\Delta C_T$ -Wert des Kalibrators wird von den  $\Delta C_T$ -Werten aller Proben abgezogen (Formel 2).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}} \quad (2)$$

Mit Hilfe des  $\Delta\Delta C_T$  kann die relative Gen-Expression (RGE) dargestellt werden (Formel 3).

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \quad (3)$$

Die RGE gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an.

## **6.6 Statistische Verfahren**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistik Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Es wurde ein globaler Vergleich aller untersuchten Zeitpunkte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests, einem nicht-parametrischen ANOVA Test, durchgeführt. Der paarweise Vergleich aller Beobachtungszeitpunkte wurde anschliessend mit Hilfe des Dunn's-Test durchgeführt, einem multiplen Vergleichstest.





## **7 Ergebnisse**

### **7.1 Expression von PPAR $\gamma$ im Corpus luteum der Hündin im Verlauf der normalen Trächtigkeit**

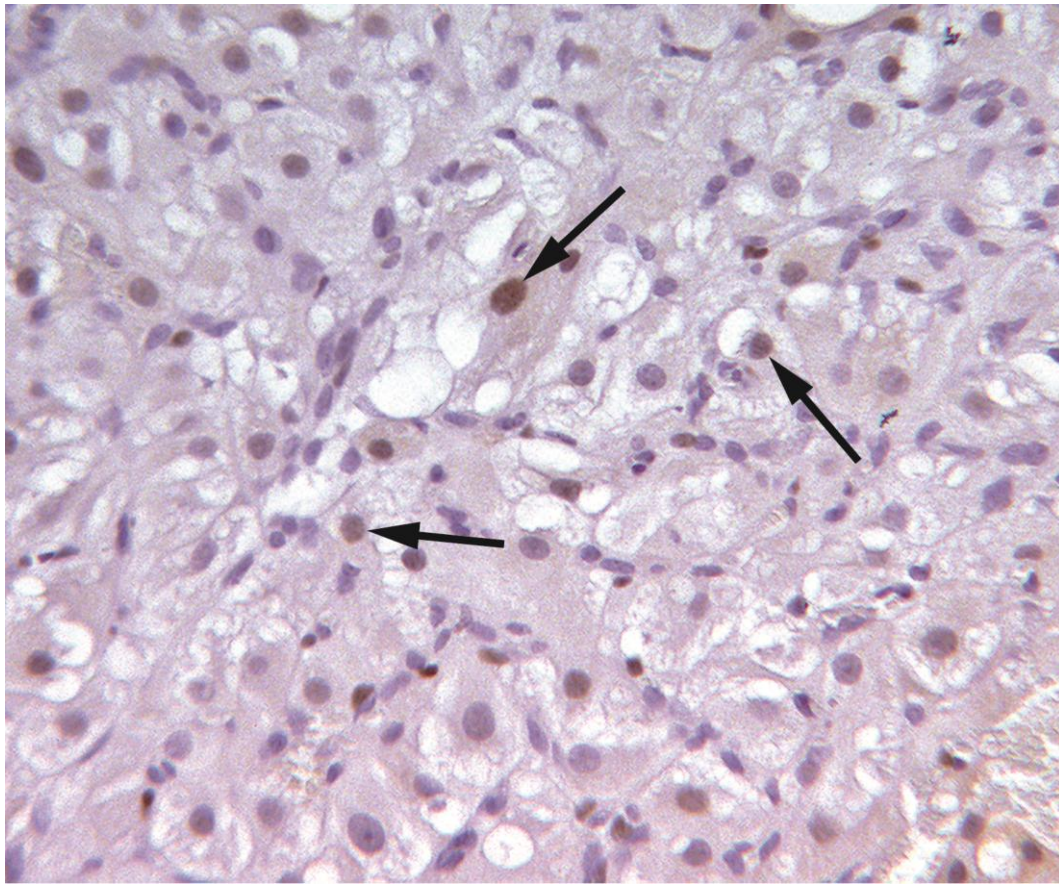
#### ***7.1.1 Immunhistochemische Darstellung der Lokalisation von PPAR $\gamma$***

Für alle Untersuchungen zur Lokalisation von PPAR $\gamma$  wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie gewählt. Dabei wurde ein im Kaninchen hergestellter monoklonaler Antikörper gegen PPAR $\gamma$  verwendet. (Kap. 6.2).

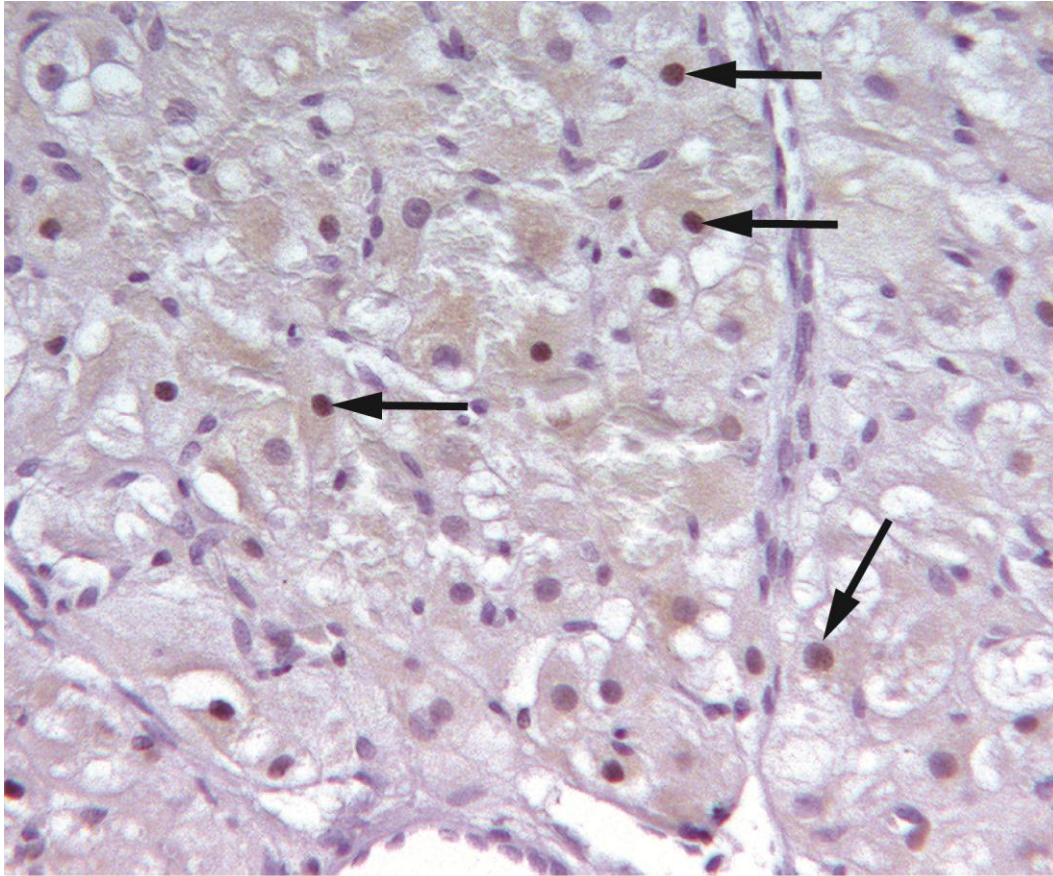
Untersucht wurden CL aller Stadien der Trächtigkeit. Es konnten zu jedem untersuchten Zeitpunkt (Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und Luteolyse) positive Signale in den Luteinzellen nachgewiesen werden. Die Signale befanden sich ausschliesslich in den Zellkernen der Luteinzellen (Abb. 7.1.1a, b).

Bei allen Negativkontrollen wurde kein Hintergrundsignal beobachtet (Abb. 7.1.1c).

Der immunhistochemische Nachweis von PPAR $\gamma$  diente ausschliesslich zur Lokalisation des Proteins in den Zellen, nicht um eine quantitative Aussage über die exprimierte Menge zu treffen.

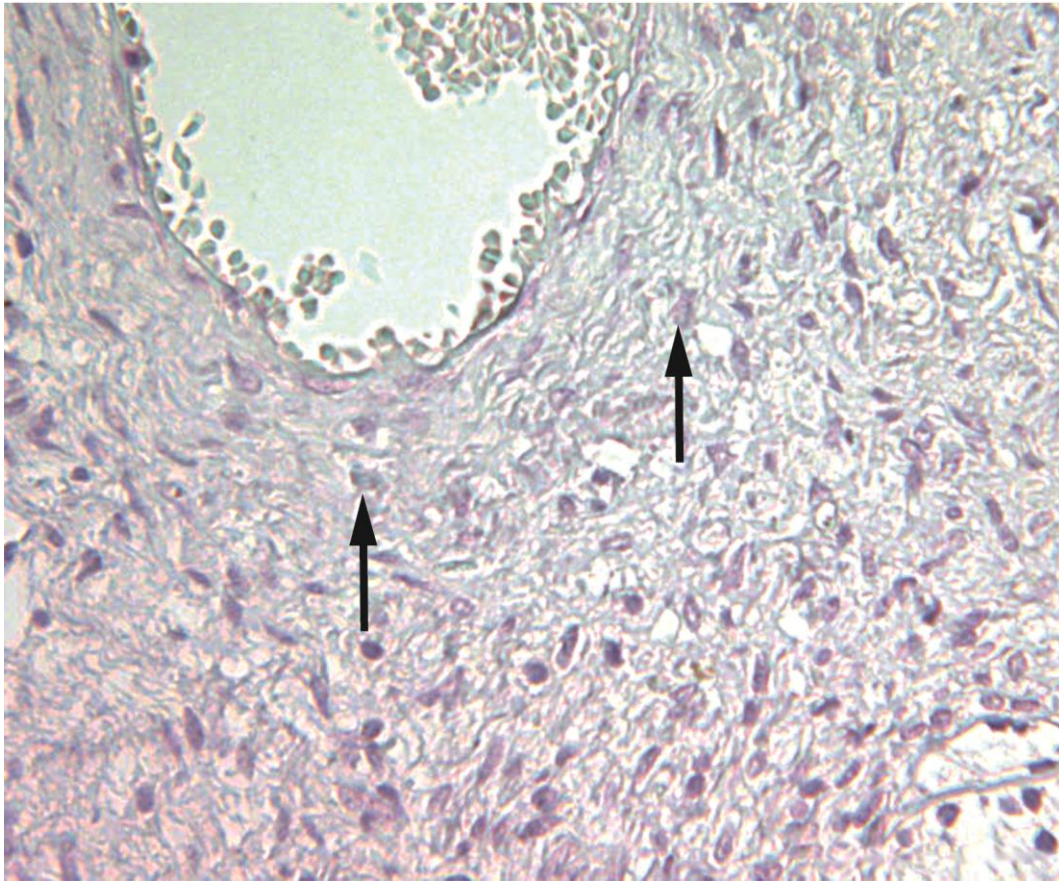


**Abb. 7.1.1a:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  im Corpus luteum während der Postimplantationsphase;  $\rightarrow$ : Kerne von Luteinzellen; 200-fache Vergrößerung.



**Abb. 7.1.1b:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  im Corpus luteum während der mittleren Trächtigkeit;  $\rightarrow$ : Kerne von Luteinzellen; 200-fache Vergrößerung.

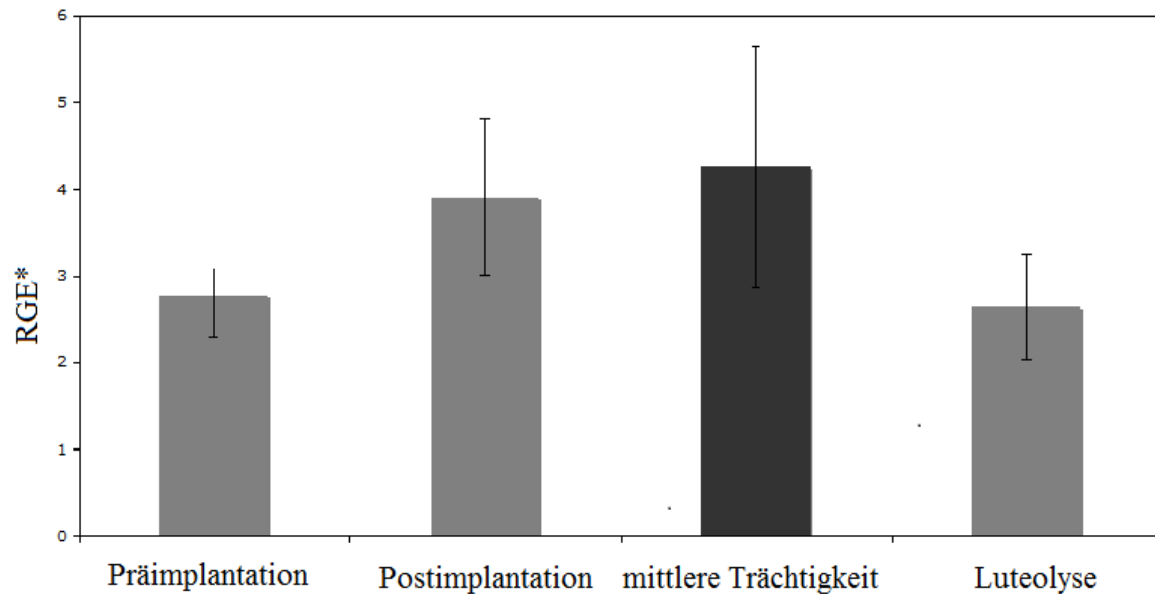




**Abb. 7.1.1c:** Kanines Corpus luteum als Negativkontrolle: keine positiven Signale oder Hintergrundfärbung erkennbar; →: Kerne von Luteinzellen; 200-fache Vergrößerung.

### 7.1.2 Real Time (TaqMan) PCR

Nach der Implantation und während der mittleren Trächtigkeit konnte mittels semiquantitativer Real Time PCR ein Anstieg der Expression der PPAR $\gamma$ -mRNA beobachtet werden. Statistisch erwies sich dieser Anstieg jedoch als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Abb. 7.1.2). Auch der Expressionsabfall während der Luteolyse erwies sich als statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

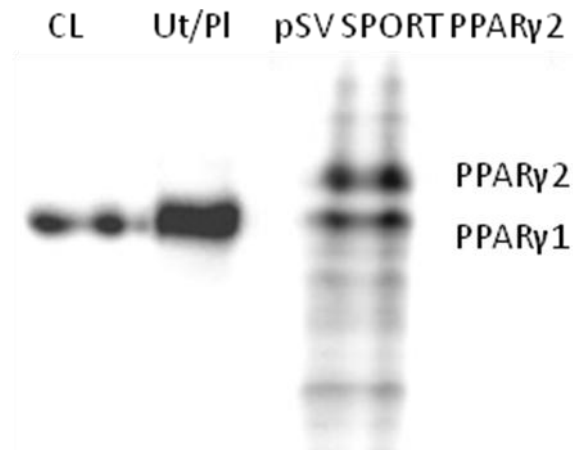


**Abb. 7.1.2:** Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA von PPAR $\gamma$  im kaninen Corpus luteum. Messungen zu 4 Zeitpunkten: Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und präpartale Luteolyse. Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ) gemessen werden. *RGE\**: *Relative Gene Expression*.

### 7.1.3 Western Blot

#### *Expression des pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmids mittels TNT-Kit*

Aus der *in vitro* Translation des pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmids gingen zwei Polypeptide hervor, PPAR $\gamma$ 2 mit einem Molekulargewicht von 56 kDa und PPAR $\gamma$ 1 mit 52 kDa. PPAR $\gamma$ 1 war bei allen hier durchgeführten Untersuchungen die einzige PPAR $\gamma$ -Isoform, welche nachgewiesen werden konnte (Abb 7.1.3a).

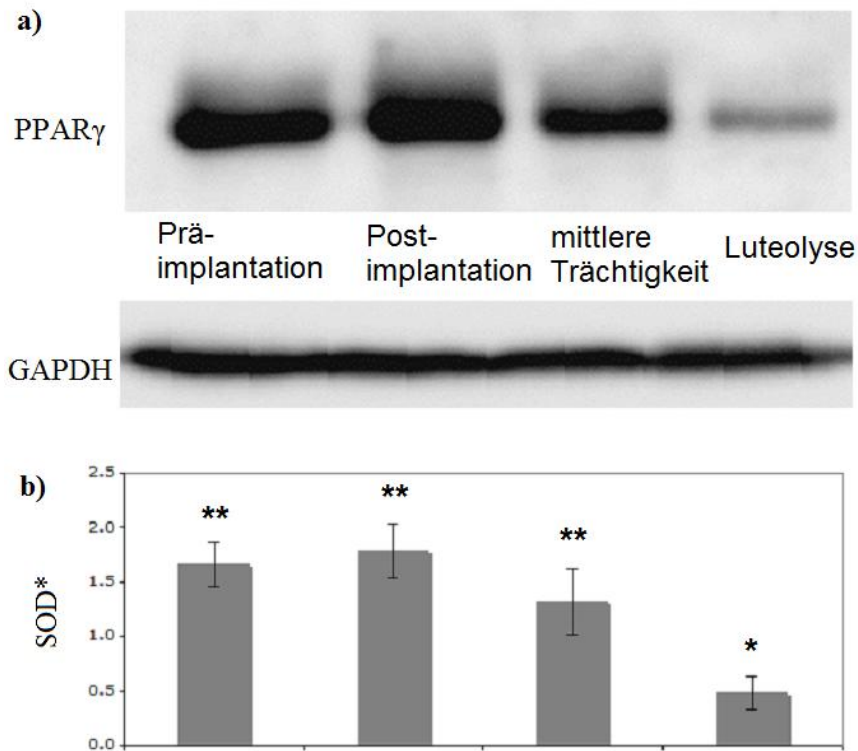


**Abb. 7.1.3a:** Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2 nach der *in vitro* Translation mittels Western Blot. Die rechte Bande zeigt die Isoformen PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2, welche aus der Expression des pSV Sport PPAR $\gamma$ 2-Plasmids resultieren. Zum Vergleich sind Proben des Corpus luteum und der uteroplazentären Einheit dargestellt, dessen PPAR $\gamma$ -Protein auf derselben Höhe wie PPAR $\gamma$ 1 nachweisbar ist.

#### *Darstellung des PPAR $\gamma$ -Proteins*

Nachdem die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnte das PPAR $\gamma$ -Protein unter Verwendung des monoklonalen PPAR $\gamma$ -Antikörpers durch Chemilumineszenz detektiert werden (Kap. 6.3.2). Die stärksten Proteinbanden wurden wie erwartet bei 52 kDa gefunden. Dies entspricht der Proteinbande des Proteins PPAR $\gamma$ 1, welches mittels der Kontrolle des pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmid dargestellt werden konnte. Die Ergebnisse sind in der Abb. 7.1.3b dargestellt.

Die Signalstärke der erhaltenen Banden wurde als optische Dichte SOD (Standardized Optical Density) gemessen und auf die Expression des *House-keeping Gene* GAPDH bezogen/normalisiert; die so erhaltenen Werte wurden graphisch dargestellt. Nach Auswertung mit Hilfe des Dunn's-Tests ergab sich ein signifikanter Zeiteffekt in der Protein-Expression im Verlauf der Trächtigkeit. Es wurde eine hohe Expression von PPAR $\gamma$  bis zur mittleren Trächtigkeit beobachtet. Danach, während der präpartalen Luteolyse, kam es zu einem signifikanten Abfall der Expression ( $p < 0,01$ ).

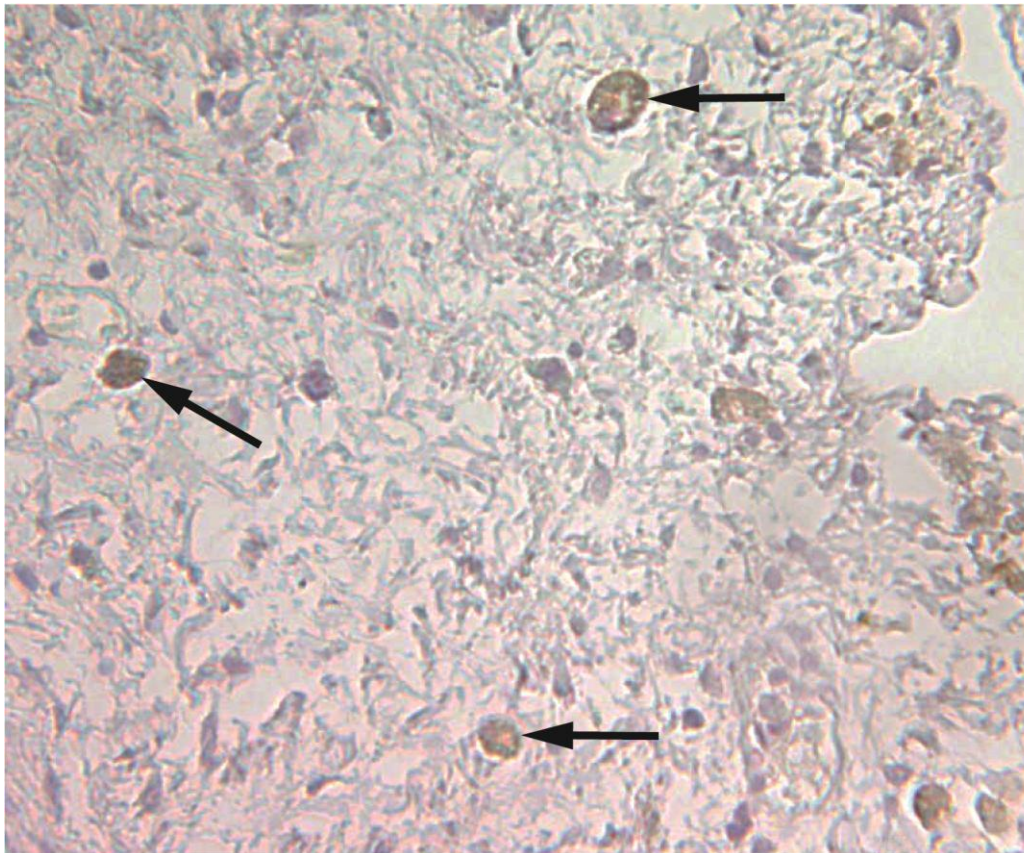


**Abb. 7.1.3b:** Western Blot: Expression des PPAR $\gamma$ -Proteins im kaninen Corpus luteum während der Trächtigkeit. Darstellung zu 4 Zeitpunkten: Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und präpartale Luteolyse. a) Expressionsmuster von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu GAPDH. b) optische Dichtemessung und graphische Darstellung der Protein-Expression. Verschiedene Sterne (\* und \*\*) bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen ( $p < 0,01$ ). *SOD\**: *Standardized Optical Density*

## 7.2 Expression von PPAR $\gamma$ im CL der Hündin bei induziertem Abort

### 7.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$

Nach induziertem Abort konnten 24 und 72 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Injektion, positive Signale für PPAR $\gamma$  beobachtet werden. Diese beschränkten sich auf die Kerne der Luteinzellen (Abb. 7.2.1). Zu diesem Zeitpunkt waren deutliche Zeichen der Luteolyse erkennbar.



**Abb. 7.2.1:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  im Corpus luteum 72 Stunden nach induziertem Abort; →: Kerne von Luteinzellen; 200-fache Vergrößerung.

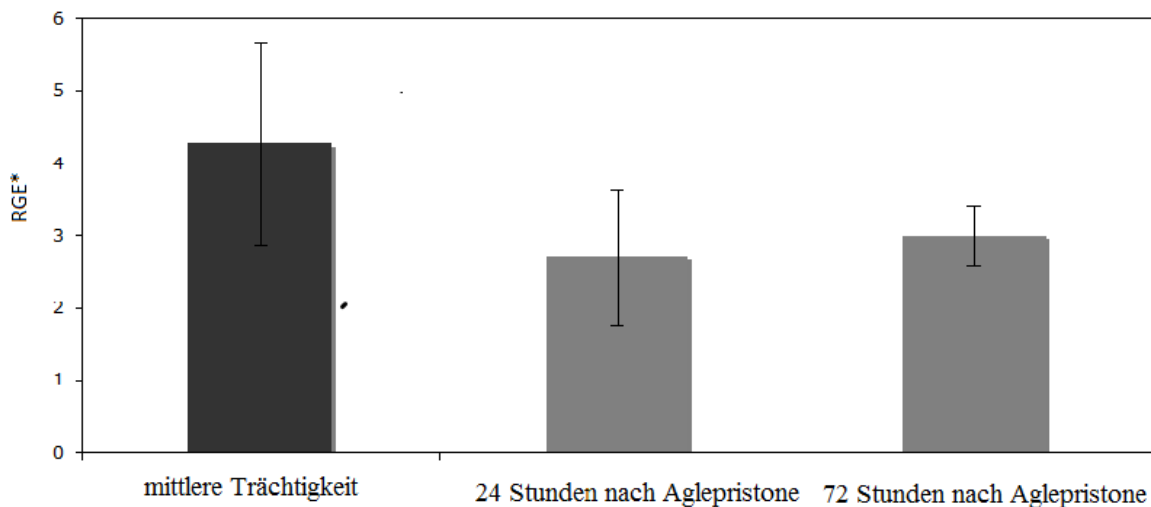
### 7.2.2 Real Time (TaqMan) PCR

Untersucht wurden jeweils die Proben der mittleren Trächtigkeit sowie diejenigen 24 und 72 Stunden nach der zweiten *Aglepriston*-Behandlung (Kap. 6.1.2).



Für diesen Zweck wurden die Ergebnisse mit der Gruppe der Hündinnen aus der mittleren Trächtigkeit verglichen, die als nicht-behandelte Kontrolle dienten.

Während der mittleren Trächtigkeit war die Expression am höchsten, 24 und 72 Stunden nach der zweiten *Aglepriston*-Injektion konnte ein Abfall der PPAR $\gamma$ -Expression beobachtet werden. Dennoch haben sich die Ergebnisse als statistisch nicht signifikant erwiesen ( $p > 0,05$ ) (Abb. 7.2.2).



**Abb. 7.2.2:** Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA von PPAR $\gamma$  im kaninen Corpus luteum nach Abortinduktion. Messungen zu 3 Zeitpunkten: mittlere Trächtigkeit, 24 und 72 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Behandlung. Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede gemessen werden ( $p > 0.05$ ). *RGE\**: *Relative Gene Expression*.

### **7.3 Expression von PPAR $\gamma$ in der uteroplazentären Einheit der Hündin im Verlauf der normalen Trächtigkeit**

#### **7.3.1 Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$**

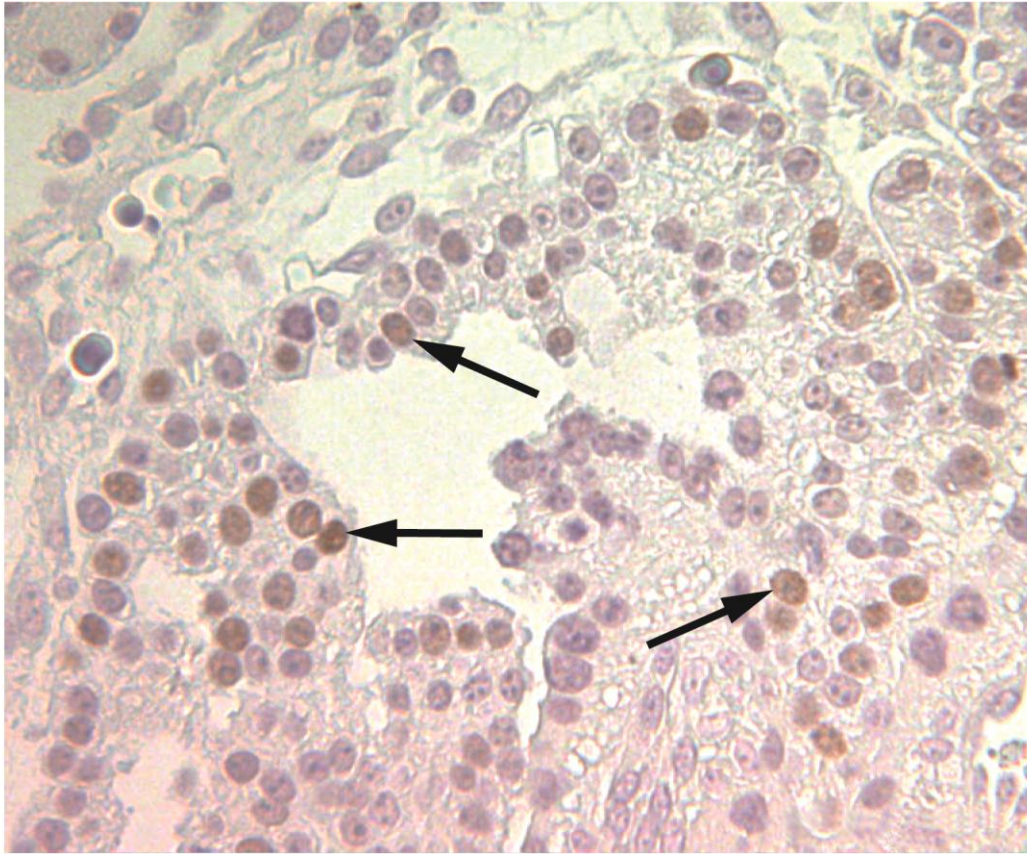
Entsprechend dem Nachweis von PPAR $\gamma$  im CL wurde auch für die Plazenta der monoklonale PPAR $\gamma$ -Antikörper aus dem Kaninchen verwendet (Kap. 6.2). Ferner wurde für die sichere Differenzierung von maternalem und fetalem Gewebe in der Plazenta ein monoklonaler, in der Maus generierter Antikörper gegen Vimentin verwendet.

Vor der Implantation, das bedeutet bevor der Trophoblast mit dem Endometrium um Tag 12 bis 13 in Kontakt tritt, konnten vereinzelt positive Signale in den Zellkernen des oberflächlichen Uterusepithels nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

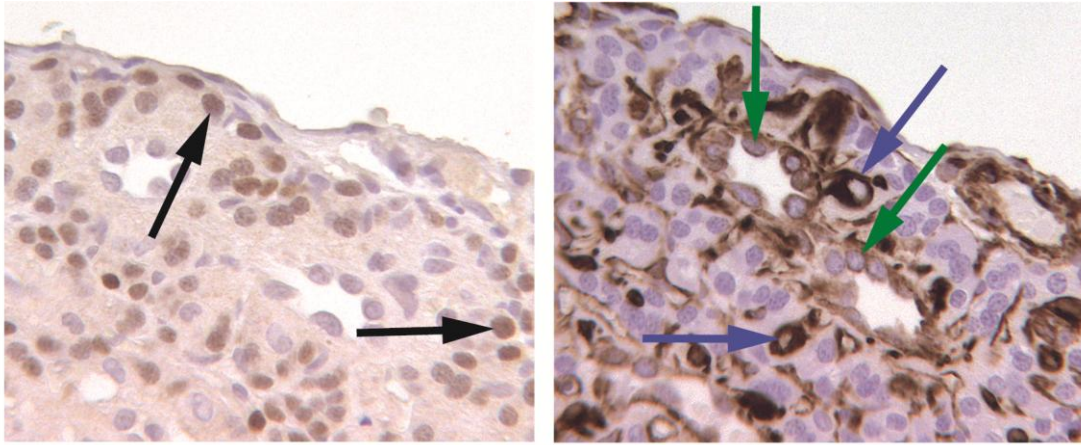
Nach der Implantation, während der mittleren Trächtigkeit und der Luteolyse konnten deutliche, regelmässig verteilte, positive Signale für PPAR $\gamma$  gesehen werden. Die immunhistochemischen Signale konnten nach der Implantation in den Kernen der fetalen Trophoblastzellen lokalisiert werden. Im maternalen Anteil der Plazenta wurden keine Signale beobachtet (Abb 7.3.1a - d).

Bei allen Negativkontrollen konnte kein Hintergrundsignal beobachtet werden (Abb. 7.3.1e).

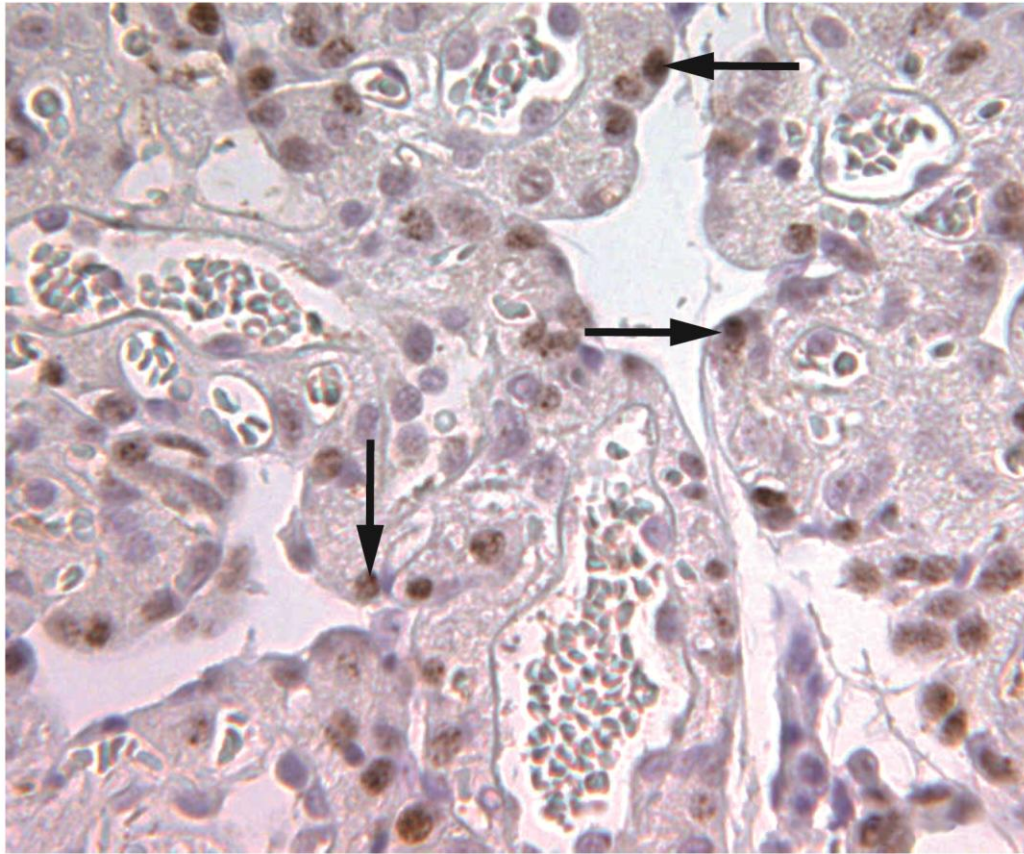
Der immunhistochemische Nachweis von PPAR $\gamma$  diente ausschliesslich zur Lokalisation des Proteins in den Zellen und nicht um eine quantitative Aussage über die exprimierte Menge zu treffen.



**Abb. 7.3.1a:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta während der mittleren Trächtigkeit. Positive Signale finden sich in den Kernen fetaler Trophoblastzellen; →: Kerne von Trophoblastzellen; 200-fache Vergrößerung.

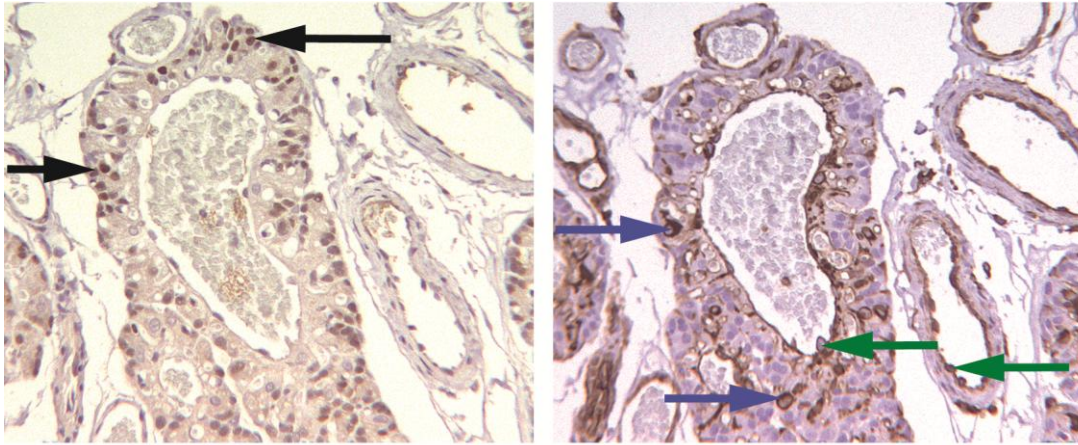


**Abb. 7.3.1b:** *links:* Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta während der mittleren Trächtigkeit. *rechts:* Nachweis mesenchymaler Strukturen zur Differenzierung von fetalem und maternalem Gewebe; gleicher Gewebeausschnitt wie links;  $\rightarrow$ : Kerne von Trophoblastzellen,  $\rightarrow$ : Dezidualzellen,  $\rightarrow$ : Endothelzellen; 200-fache Vergrößerung.

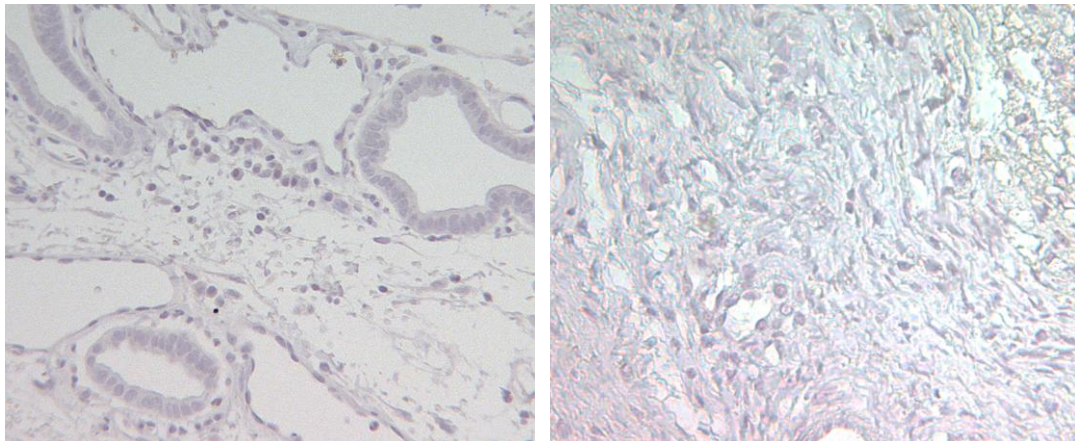


**Abb. 7.3.1c:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta während der präpartalen Luteolyse. Positive Signale finden sich in den Kernen fetaler Trophoblastzellen; →: Kerne von Trophoblastzellen; 200-fache Vergrößerung.





**Abb. 7.3.1d:** *links:* Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta während der präpartalen Luteolyse. Positive Signale für PPAR $\gamma$  in den Kernen fetaler Trophoblastzellen. *rechts:* Nachweis mesenchymaler Strukturen zur Differenzierung von fetalem und maternalem Gewebe; gleicher Gewebeausschnitt wie links;  $\rightarrow$ : Kerne von Trophoblastzellen,  $\rightarrow$ : Dezidualzellen,  $\rightarrow$ : Endothelzellen; 200-fache Vergrößerung.



**Abb. 7.3.1e:** *links:* tiefe Drüsenschicht des kaninen Uterus, *rechts:* kanine Plazenta als Negativkontrolle; 200-fache Vergrößerung.

### 7.3.2 Real Time (TaqMan) PCR

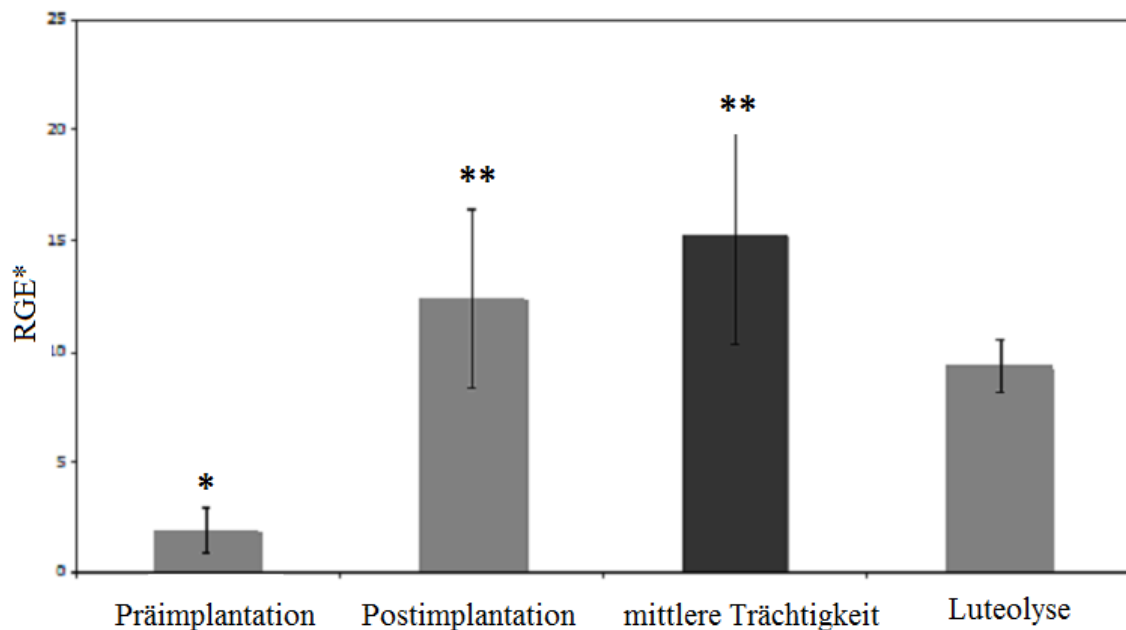
In der kaninen uteroplazentären Einheit konnte nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests ein signifikanter, zeitabhängiger Unterschied ( $p > 0,01$ ) im Expressionsmuster der PPAR $\gamma$ -mRNA festgestellt werden.

Auch der Dunn's multiple comparison Test zeigte signifikante Unterschiede auf: die niedrigste PPAR $\gamma$ -Expression war vor der Implantation sichtbar. Im Vergleich zum Stadium

der Präimplantation erfolgt eine signifikante Zunahme der Expression nach der Implantation ( $p < 0,05$ ) und während der mittleren Trächtigkeit ( $p < 0,01$ ).

Während der präpartalen Luteolyse konnte eine Tendenz zur Abnahme der PPAR $\gamma$ -Expression gesehen werden. Nach statistischer Auswertung konnte aber keine Signifikanz zwischen der Implantation bzw. mittleren Trächtigkeit und der präpartalen Luteolyse festgestellt werden ( $p > 0,05$ ) (Abb. 7.3.2).

Alle erhaltenen Werte wurden mit GAPDH normalisiert.

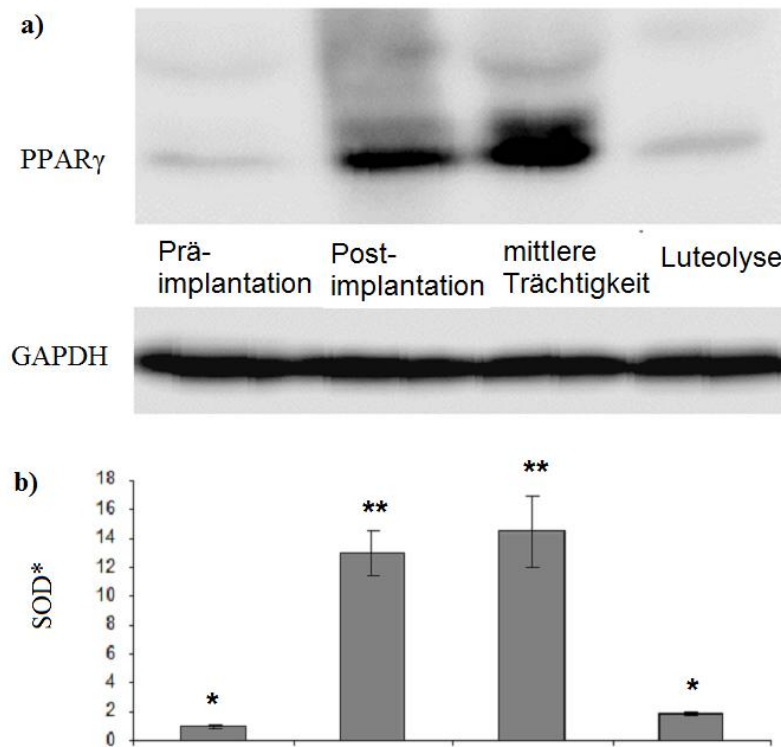


**Abb. 7.3.2:** Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA von PPAR $\gamma$  in der kaninen uteroplazentären Einheit. Messungen zu 4 Zeitpunkten: Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und präpartale Luteolyse. Verschiedene Sterne (\* und \*\*) bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen (Dunn's-Test): Signifikanter Unterschied zwischen Präimplantation und Postimplantation ( $p < 0,05$ ) bzw. mittleren Trächtigkeit ( $p < 0,01$ ). RGE\*: *Rrelative Gene Expression (SD)*.

### 7.3.3 Western Blot

Wie auch bei den CL-Proben wurde auch hier die Expression des PPAR $\gamma$ -Proteins mittels Chemilumineszenz dargestellt und im Vergleich zu GAPDH normalisiert.

Entsprechend der PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene, konnte auch auf Protein-Ebene die niedrigste Expression vor der Implantation festgestellt werden. Darauf folgte eine signifikante Zunahme in der Postimplantationsphase ( $p < 0,01$ ) und der mittleren Trächtigkeit ( $p < 0,01$ ). Während der präpartalen Luteolyse fand ein signifikanter Abfall statt ( $p < 0,01$ ) (Abb. 7.3.3).



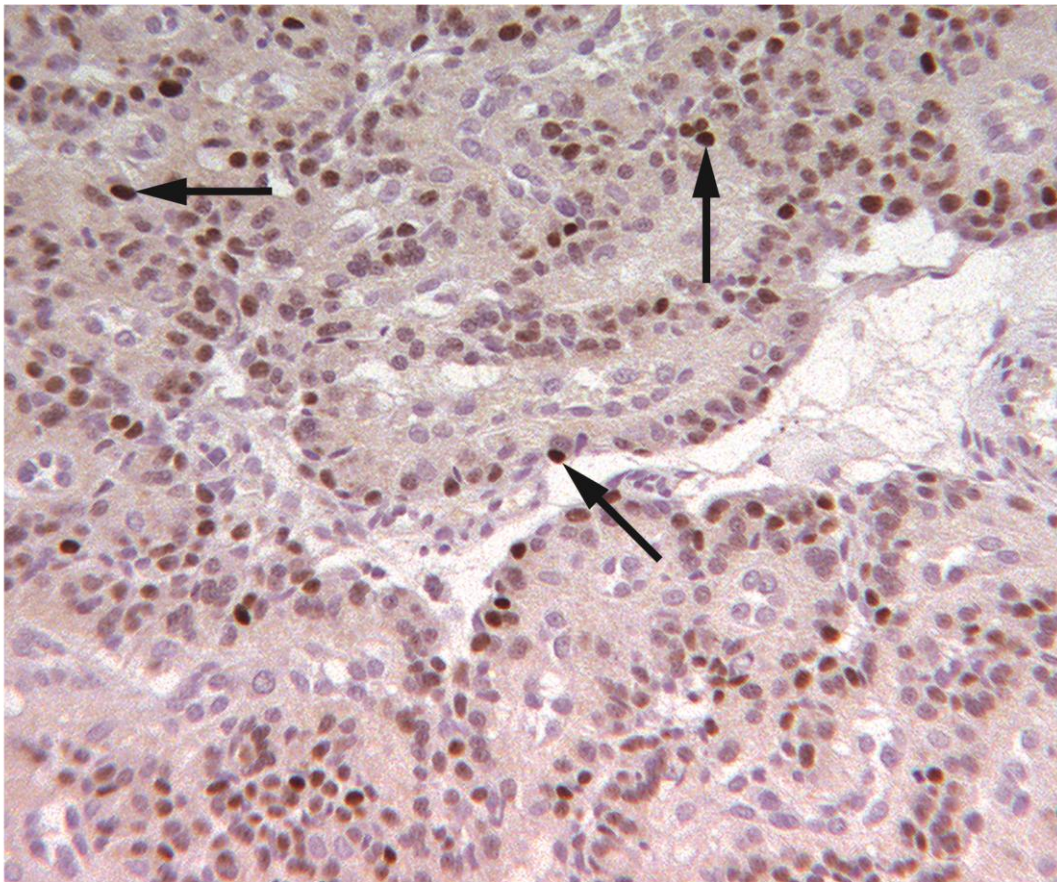
**Abb. 7.3.3:** Western Blot: Expression des PPAR $\gamma$ -Proteins in der Plazenta während der Trächtigkeit. Darstellung zu 4 Zeitpunkten: Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und präpartale Luteolyse. a) Expressionsmuster von PPAR $\gamma$  im Vergleich zu GAPDH. b) optische Dichtemessung und graphische Darstellung der Protein-Expression. Verschiedene Sterne (\* und \*\*) bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen (Dunn's-Test): Während der Präimplantation und Luteolyse wird signifikant weniger PPAR $\gamma$  gebildet als nach der Implantation und während der mittleren Trächtigkeit ( $p < 0,01$ ). SOD\*: *Standardized Optical Density*.



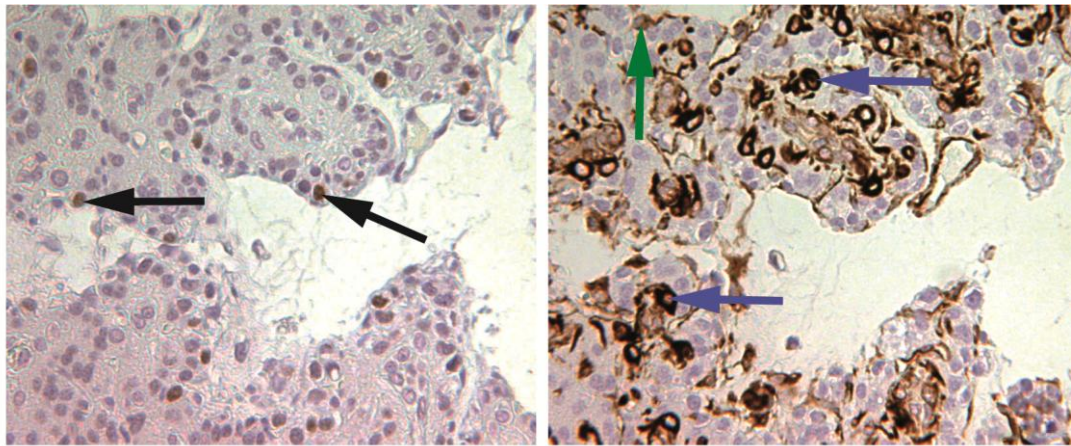
## 7.4 Expression von PPAR $\gamma$ in der uteroplazentären Einheit der Hündin bei induziertem Abort

### 7.4.1 Immunhistochemische Darstellung der Expression von PPAR $\gamma$

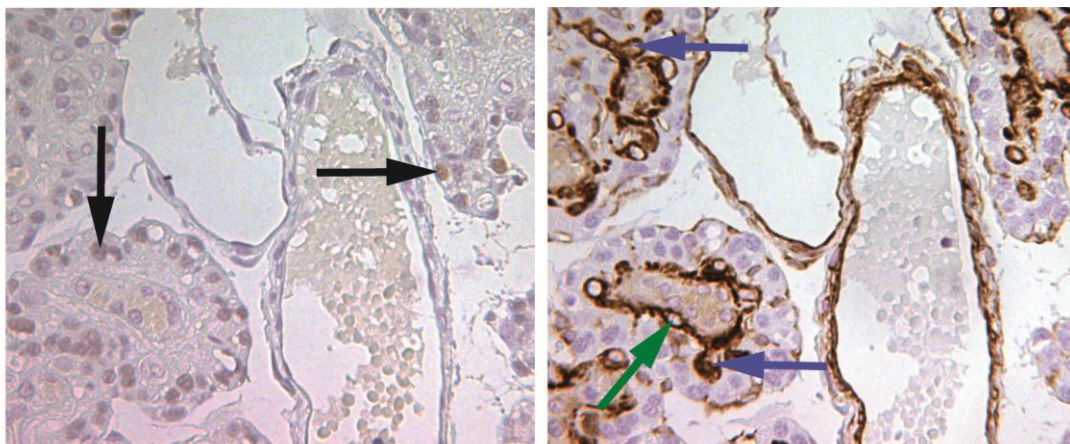
Positive Signale für PPAR $\gamma$  wurden in der Plazenta bei den Hündinnen mit induziertem Abort, 24 und 72 Stunden nach der zweiten *Aglepriston*-Injektion, in den fetalen Trophoblastzellen nachgewiesen. Die Signale wurden ausschliesslich in den Zellkernen lokalisiert (Abb. 7.4.1a - c).



**Abb. 7.4.1a:** Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta 24 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Injektion; →: Kerne von Trophoblastzellen; 200-fache Vergrößerung.



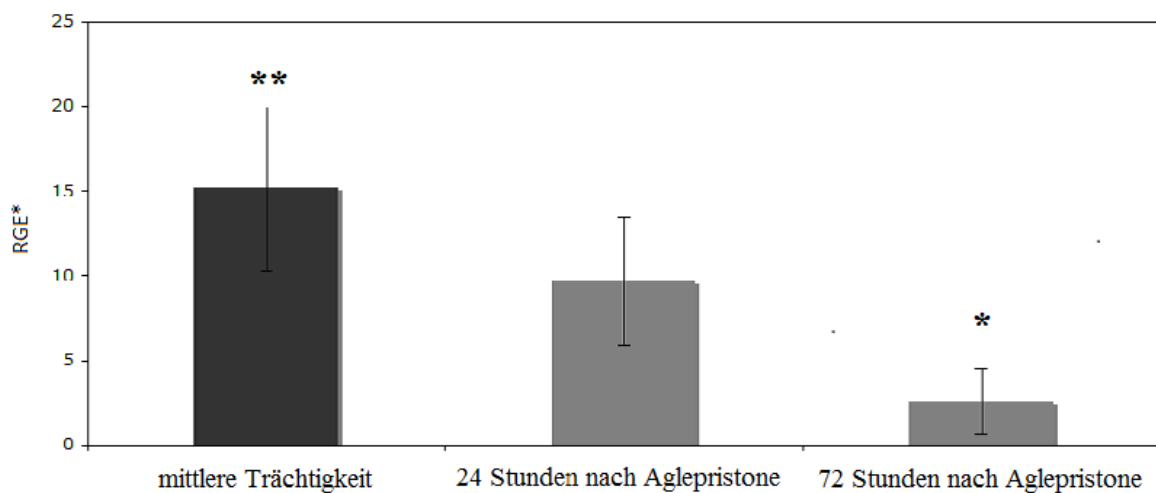
**Abb. 7.4.1b:** *links:* Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta 24 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Injektion. Positive Signale finden sich in den fetalen Trophoblastzellen. *rechts:* Nachweis mesenchymaler Strukturen zur Differenzierung von fetalem und maternalem Gewebe; gleicher Gewebeausschnitt wie links;  $\rightarrow$ : Kerne von Trophoblastzellen,  $\rightarrow$ : Dezidualzellen,  $\rightarrow$ : Endothelzellen; 200-fache Vergrößerung.



**Abb. 7.4.1c:** *links:* Immunhistochemische Darstellung von PPAR $\gamma$  in der kaninen Plazenta 72 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Injektion. Positive Signale finden sich in den fetalen Trophoblastzellen. *rechts:* Nachweis mesenchymaler Strukturen zur Differenzierung von fetalem und maternalem Gewebe; gleicher Gewebeausschnitt wie links;  $\rightarrow$ : Kerne von Trophoblastzellen,  $\rightarrow$ : Dezidualzellen,  $\rightarrow$ : Endothelzellen; 200-fache Vergrößerung.

#### 7.4.2 Real Time (TaqMan) PCR

Nach induziertem Abort um Tag 40 - 45 der Trächtigkeit wurde die Expression von PPAR $\gamma$  mit den Proben der Tiere während der mittleren Trächtigkeit verglichen; diese Gruppe diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Das Expressionsmuster der PPAR $\gamma$ -mRNA zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf wie während der mittleren Trächtigkeit bis hin zur präpartalen Luteolyse. Die Abnahme der PPAR $\gamma$ -Expression in der Plazenta 24 Stunden nach der zweiten *Aglepriston*-Behandlung war im Vergleich zur mittleren Trächtigkeit statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); im Gegensatz dazu konnte nach 72 Stunden ein signifikanter Abfall beobachtet werden ( $p < 0,01$ ) (Abb. 7.4.2).



**Abb. 7.4.2:** Real Time (TaqMan) PCR: Expression der mRNA von PPAR $\gamma$  in der kaninen uteroplazentären Einheit nach induziertem Abort. Darstellung zu 3 Zeitpunkten: mittlere Trächtigkeit, 24 Stunden und 72 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Behandlung. Verschiedene Sterne (\* und \*\*) bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen (Dunn's-Test): Signifikanter Unterschied zwischen mittlerer Trächtigkeit und 72 Stunden nach zweiter *Aglepriston*-Behandlung ( $p < 0,05$ ). RGE\*: *Relative Gene Expression*.





## 8 Diskussion

Die Expression von PPAR $\gamma$  konnte bei vielen Tierarten in den Reproduktionsorganen nachgewiesen werden. Dessen Einfluss und die regulatorischen Funktionen wurden in der Endokrinologie der Fortpflanzung in zahlreichen Arbeiten untersucht und diskutiert. In den Gonaden ist PPAR $\gamma$  in die Steroidogenese involviert. Neuere Untersuchungen zeigten einen entscheidenden Effekt auf die Ovulation bei Mäusen durch die Beeinflussung der Signalkaskade, welche über die Progesteronrezeptoren in den Granulosazellen ausgelöst wird (Kim *et al.*, 2008). In der Plazenta übernimmt PPAR $\gamma$  die Rolle eines von mehreren Schlüsselfaktoren, welche für die Implantationsvorgänge verantwortlich sind. Barak *et al.* (1999) konnten eine Beeinträchtigung der Trophoblastdifferenzierung und der Durchblutung der Plazenta anhand von PPAR $\gamma$ -*knock out* Mäusen nachweisen.

Im Unterschied zu anderen Spezies gab es bis anhin beim Hund noch keine Informationen zur Expression und der potentiellen Rolle von PPAR $\gamma$  in der Reproduktion. Aus diesem Grund waren in der vorliegenden Arbeit das Expressionmuster und die zelluläre Lokalisation von PPAR $\gamma$  im CL und der uteroplazentären Einheit bei der Hündin Gegenstand der Untersuchungen. Eingeschlossen waren dabei verschiedene Stadien der Trächtigkeit: die Präimplantation (Tag 8 - 12 p.o.), die Postimplantation (Tag 18 - 25 p.o.), die mittlere Trächtigkeit (Tag 35 - 40 p.o.) sowie das Stadium der präpartalen Luteolyse. Um weitere Einblicke in die endokrinen Regulationsmechanismen zu bekommen, wurden bei Hündinnen während der mittleren Trächtigkeit mit dem Antigestagen *Aglepriston* behandelt und so ein Abort ausgelöst. Als Kontrollgruppe zu den mit *Aglepriston* behandelten Tieren wurden Gewebeproben von unbehandelten Tieren während der mittleren Trächtigkeit verwendet. So wurden Vergleiche von verschiedenen endokrinen Faktoren zwischen einer normalen und einer induzierten Geburt ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der Lokalisation der Expression von PPAR $\gamma$  auf Proteinebene mittels Immunhistochemie. Dabei wurde keine Aussage über die exprimierte Menge des PPAR $\gamma$ -Poteins gemacht.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden jeweils Kontrollen mitgeführt. Dazu dienten Proben aller untersuchten Gewebetypen, welche jeweils ohne Primärantikörper (Negativkontrolle) bzw. mit einem nicht-immunogenen Kaninchenserum (Isotypenkontrolle) verarbeitet wurden. Mit den Negativkontrollen wurde überprüft, ob das Detektionssystem, d.h. der sekundäre Antikörper und das ABC-System unspezifische Signale erzeugen. Die

Isotypenkontrolle diente der Sicherstellung, dass im Kaninchenserum kein unspezifisch bindender Antikörper vorhanden ist. Bei allen so verarbeiteten Proben wurden ausschliesslich negative Ergebnisse erhalten.

Ausserdem wurde die Expression von PPAR $\gamma$  mittels Western Blot untersucht. Diese Methode erlaubte die semi-quantitative Aussage über die Expression des PPAR $\gamma$ -Proteins während der jeweiligen Trächtigkeitsstadien.

Als Kontrolle diente die *in vitro*-Expression des pSV SPORT PPAR $\gamma$ 2-Plasmids. Dabei konnten die beiden Isoformen PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2 dargestellt werden. Bei allen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit kaninem CL und uteroplazentären Einheiten konnte nur die Isoform PPAR $\gamma$ 1 nachgewiesen werden. Beide Isoformen resultieren aus alternativem Splicing der mRNA. Dies könnte ein Hinweis auf die Spezifität des untersuchten Gewebes und/oder speziesspezifische Expression dieses Proteins sein. Eine ähnliche Situation konnte in Zellkulturen mit immortalisierten KK1-Granulosazellen und MA-10-Leydigzellen der Maus beobachtet werden (Kowalewski *et al.*, 2009b). In den MA-10-Zellkulturen dominierte PPAR $\gamma$ 2, in den KK1-Zellen hingegen wurden beide Isoformen gefunden (Kowalewski *et al.*, 2009b).

Mit Hilfe der Real Time PCR wurde das Expressionsprofil des untersuchten Gens auf mRNA-Ebene im Verlauf der Trächtigkeit und während eines induzierten Aborts erstellt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die relative quantitative Real Time PCR mittels des TaqMan-Sonden-Verfahrens. Der Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Spezifität im Vergleich zu anderen PCR-Verfahren. Ein Nachteil sind sicher die hohen Kosten, welche durch die Synthese und Markierung der TaqMan-Sonden verursacht werden.

Die erhaltenen Daten zeigen deutlich die Expression von PPAR $\gamma$  im kaninen lutealen und uteroplazentären Gewebe. Die Expression wird während der Trächtigkeit wie auch bei induziertem Abort zeitabhängig signifikant moduliert. Während und nach der Plazentabildung konnte die PPAR $\gamma$ -Expression in den epithelialen Trophoblastzellen lokalisiert werden. Zum Zeitpunkt der mittleren Trächtigkeit wurde eine deutliche Aufregulation der Expression beobachtet, danach folgte ein signifikanter Abfall während der präpartalen Luteolyse. Ein ähnlicher Verlauf der PPAR $\gamma$ -Expression zeigte sich im lutealen Gewebe. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei anderen Tierarten gemacht. Beispielsweise lokalisierten Asami-Miyagishi *et al.* (2004) bei der Ratte die Expression von PPAR $\gamma$  in den

Trophoblastzellen und zeigten eine Aufregulation der Expression im Verlauf der Trächtigkeit. Interessanterweise waren in der vorliegenden Arbeit alle Veränderungen im Expressionsmuster von PPAR $\gamma$  im kaninen Gewebe deutlicher auf Protein-Ebene zu sehen als auf der mRNA-Ebene. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Expression auf posttranskriptionellem Niveau reguliert wird.

Die kanine endotheliochoriale Plazenta ist durch eine ausgeprägte Invasivität des fetalen Trophoblasten und den daraus resultierenden Abbau des oberflächlichen Anteils des maternalen Endometriums charakterisiert (Kap. 4.5) (Schnorr & Kressin, 2001). Der Trophoblast besitzt aufgrund seiner Metalloproteinasen (MMPs) starke proteolytische Eigenschaften, die es ihm erlauben, durch das Oberflächenepithel des Endometriums und das darunterliegende Stroma bis zu den Endothelzellen der Blutgefäße vorzudringen. Mittels Zymographie wurde ein vermehrtes Vorkommen von aktiven MMPs, insbesondere von MMP-2 und MMP-9, während der Implantation und Plazentation gezeigt (Beceriklisoy *et al.*, 2007). Im Verlauf der Plazentation konnte MMP-2 vorwiegend in den fetalen Blutgefäßen und den Trophoblastzellen lokalisiert werden. Die stärkste MMP-9-Aktivität wurde im Endometrium während der Präimplantation nachgewiesen (Beceriklisoy *et al.*, 2007).

Die Lokalisation von PPAR $\gamma$  im Trophoblasten im Verlauf der gesamten Trächtigkeit ergibt starke Hinweise auf dessen Rolle bei der plazentären Entwicklung, möglicherweise durch die Beeinflussung der Invasion der fetalen Trophoblastzellen. Dies wird vor allem verdeutlicht, wenn man die reduzierte Implantationsrate und die ungenügende Entwicklung der Plazenta bei *knock-out* Mäusen und Ratten berücksichtigt (Barak *et al.*, 1999; Asami-Miyagishi *et al.*, 2004). Möglicherweise besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen PPAR $\gamma$  und den MMPs, wofür derzeit aber keine Daten vorliegen.

Eine interessante Eigenschaft von PPAR $\gamma$  ist die Funktion als alternativer Rezeptor für endogene Metaboliten der Arachidonsäure, wie beispielsweise Prostaglandine oder Metaboliten von Lipoxygenasen und Epoxygenasen (Übersicht bei Komar, 2005). Insbesondere im Ovar scheint dies sehr wahrscheinlich zu sein, da in diesem Gewebe Cox-2-Metaboliten klar als Regulatoren der PPAR $\gamma$ -regulierten Genexpression gezeigt wurden (Kim *et al.*, 2008). Eine kürzlich veröffentlichte Studie (Kowalewski *et al.*, 2010) weist auf eine para/autokrine Rolle von Arachidonsäure-Metaboliten (Cox-2-Syntheseweg) während der Dezidualisation und Plazentation hin. Eine derartige para/autokrine Rolle von Prostaglandinen, deren Ursprung in der Plazenta zu suchen ist, wurde bereits beim Rind und

bei der Maus beschrieben (Arosh *et al.*, 2004; Schuler *et al.*, 2006; Pakrasi & Jain, 2008). Dies lässt vermuten, dass PPAR $\gamma$  die lokalen, in der kaninen Plazenta synthetisierten Prostaglandine als endogene Liganden benutzen könnte. Weitere Beobachtungen, wie beispielsweise die Kolo-kalisation von PPAR $\gamma$  und PGF $_{2\alpha}$ - und PGE $_2$ -Synthasen im lutealen und plazentären Gewebe (Kowalewski *et al.*, 2009a, 2010) unterstützen diese Hypothese noch zusätzlich. Trotz diesen Hinweisen sind noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Schlussfolgerung zu untermauern.

Wie im Verlauf einer normalen Luteolyse führt die Blockade der Progesteronrezeptoren im kaninen CL und Plazenta mit einem Antigestagen zu ähnlichen Veränderungen in der Expression des lutealen und plazentären Prostaglandin-Systems (Kowalewski *et al.*, 2009a, 2010). Einerseits kommt es bei der induzierten wie auch der physiologischen Luteolyse zu einem signifikanten Abfall der PGF $_{2\alpha}$ -Synthase in den CL (Kowalewski *et al.*, 2009a). Andererseits kann in beiden Fällen ein deutlicher präpartaler PGF $_{2\alpha}$ -Anstieg gesehen werden, welcher von den fetalen Trophoblastzellen herrührt (Kowalewski *et al.*, 2010).

Mit Blick auf diese früheren Studien konnte in der vorliegenden Arbeit eine interessante Feststellung gemacht werden: die Behandlung mit dem Progesteronrezeptorantagonisten *Aglepriston* während der mittleren Trächtigkeit führte zu einer Down-Regulation von PPAR $\gamma$  im CL und in der uteroplazentären Einheit. Die gleichen Beobachtungen wurden während der präpartalen Luteolyse gemacht. Somit resultiert die funktionelle Beteiligung des lutealen und plazentären Progesteronrezeptors zum einen in der Ruhigstellung des Uterus, zum anderen übernimmt er mit grösster Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle als endokriner Faktor bei der Plazentation. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen von Kim *et al.* (2008), Barak *et al.* (1999) und Asami-Miyagishi *et al.* (2004), die PPAR $\gamma$  die Rolle eines Hauptregulators in der lutealen und plazentären Funktion bei Mäusen und Ratten zuschreiben. Des Weiteren sind die Dezidualzellen die einzigen Zellen der kaninen Plazenta, welche Progesteronrezeptoren exprimieren. Diese Zellen scheinen eine entscheidende Signalfunktion in der zugrundeliegenden fetomaternalen Kommunikation zu haben; sie besitzen die Kontrolle über die Plazentaentwicklung und Trophoblastinvasion bei der Hündin.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie eine zeitabhängige Expression und Lokalisation von PPAR $\gamma$  im kaninen CL und in der uteroplazentären Einheit im Verlauf der Trächtigkeit. Mögliche funktionelle Auswirkungen der PPAR $\gamma$ -vermittelten Regulation auf die endokrine Funktion dieser Gewebe zeigen die Ergebnisse der Antigestagen-Behandlung. Sie verdeutlichen die wichtige Rolle von PPAR $\gamma$  in der Progesteron-gesteuerten Regulation



der kaninen lutealen und plazentären Funktion. Somit scheint PPAR $\gamma$  ein wichtiger Faktor bei der Regulation der lutealen und plazentären Funktion beim Hund zu sein. Die vorgelegte Studie weist damit auf einen neuen Aspekt bei der Regulation der Reproduktionsfunktion beim Hund hin.



## 9 Literaturverzeichnis

- Adams, E. C. & A. T. Hertig, 1969: Studies on the human corpus luteum. I. Observations on the ultrastructure of development and regression of the luteal cells during the menstrual cycle. *J Cell Biol*, **41**, 696-715.
- Andersen, A. & M. E. Simpson, 1973: The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). *Geron-X Inc. Los Altos, California*.
- Anderson, J. W., 1969: Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I. The placental labyrinth. *Anat Rec*, **165**, 15-35.
- Arbeiter, K., 1994: Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze. *Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart, Veterinärmedizinische Endokrinologie*, 823-841.
- Arici, A., E. Oral, O. Bukulmez, S. Buradagunta, O. Engin & D. L. Olive, 1996: Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology*, **137**, 3762-3769.
- Arosh, J. A., S. K. Banu, P. Chapdelaine, E. Madore, J. Sirois & M. A. Fortier, 2004: Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, **145**, 2551-2560.
- Asami-Miyagishi, R., S. Iseki, M. Usui, K. Uchida, H. Kubo & I. Morita, 2004: Expression and function of PPAR gamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 497-501.
- Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder & R. M. Evans, 1999: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, **4**, 585-595.
- Barrau, M. D., J. H. Abel, C. A. Torbit & W. J. Tietz, 1975: Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *Am J Anat*, **143**, 115-130.

- Beceriklisoy, H. B., I. Walter, S. Schäfer-Somi, I. Miller, H. Kanca, H. Izgur & S. Aslan, 2007: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the canine uterus before and during placentation. *Reprod Domest Anim*, **42**, 654-659.
- Berger, J. & D. E. Möller, 2002: The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, **53**, 409-435.
- Berisha, B., D. Schams, M. Kosmann, W. Amselgruber & R. Einspanier, 2000: Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*, **63**, 1106-1114.
- Birgel, E. H., H. Zerbe & E. Grunert, 1996: Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen. *Praktischer Tierarzt*, **77**, 627-630.
- Boonyaparakob, U., J. E. Gadsby, V. Hedgpeth, P. Routh & G. W. Almond, 2003: Cloning of pig prostaglandin F2 alpha FP receptor cDNA and expression of its mRNA in the corpora lutea. *Reproduction*, **125**, 53-64.
- Brännström, M. & R. J. Norman, 1993: Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod*, **8**, 1762-1775.
- Bulmer, D., 1964: The histochemistry of ovarian macrophages in the rat. *J Anat*, **98**, 313-319.
- Büsges, F., 2003: Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHC-II Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus. *Inaugurale Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Capparuccia, L., D. Marzioni, A. Giordano, F. Fazioli, M. De Nictolis, N. Busso, T. Todros & M. Castellucci, 2002: PPAR gamma expression in normal human placenta, hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Mol Hum Reprod*, **8**, 574-579.
- Chedrese, P. J., 2009: Reproductive Endocrinology. *Springer Science & Business Media, New York*, 1. Auflage.

- Chen, S. H., V. Zanagnolo, S. Preutthipan, K. P. Roberts, S. B. Goodman & A. M. Dharmarajan, 1997: The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and estradiol in rabbit corpus luteum progesterone production. *Endocrine*, **6**, 73-77.
- Cheung, N., M. P. Wong, S. T. Yuen, S. Y. Leung & L. P. Chung, 1998: Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol*, **29**, 910-914.
- Chew, B. P., R. E. Erb, J. F. Fessler, C. J. Callahan & P. V. Malven, 1979: Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. *J Dairy Sci*, **62**, 557-566.
- Christiansen, 1984: Reproduction in the Cat and Dog. *Bailliere Tindall, London*.
- Christie, D. W., J. B. Bailey & E. T. Bell, 1972: Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *Br Vet J*, **128**, 301-310.
- Colon, J., M. Kimball, B. Hansen & P. W. Concannon, 1993: Effects of contraceptive doses of the progestagen megestrol acetate on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in female dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, **47**, 519-521.
- Concannon, P. W., 1980: Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. *J Reprod Fertil*, **58**, 407-410.
- Concannon, P. W., P. Weinstein, S. Whaley & D. Frank, 1987: Suppression of luteal function in dogs by luteinizing antiserum and by bromocryptine. *J Reprod Fertil*, **81**, 175-180.
- Concannon, P. W., L. Isaman, D. A. Frank, F. J. Michel & W. B. Currie, 1988: Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil*, **84**, 71-77.
- Concannon, P. W., J. P. McCann & M. Temple, 1989: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, **39**, 3-25.

- Concannon, P. W., 1993: Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, **47**, 3-27.
- Crocker, I. P., S. Cooper, S. C. Ong & P. N. Baker, 2003: Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol*, **162**, 637-643.
- Cui, Y., K. Miyoshi, E. Claudio, U. K. Siebenlist, F. J. Gonzalez, J. Flaws, K. U. Wagner & L. Hennighausen, 2002: Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR gamma ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem*, **277**, 17830-17835.
- Cupps, P. T., 1991: Reproduction in domestic animals. *Academic Press, Inc., San Diego, California*, 4. Auflage.
- Davis, J. S. & B. R. Rueda, 2002: The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci*, **7**, d1949-1978.
- Davis, J. S., B. R. Rueda & K. Spanel-Borowski, 2003: Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*, **1**, 89.
- Dawood, M. Y., R. Chellaram & F. S. Khan-Dawood, 1997: Interleukin-1 beta inhibits in vitro pulsatile progesterone secretion and stimulates prostaglandin F2 alpha secretion by micro-retrodialyzed baboon corpus luteum. *Horm Metab Res*, **29**, 483-490.
- Dickson, S. E., R. Bicknell & H. M. Fraser, 2001: Mid-luteal angiogenesis and function in the primate is dependent on vascular endothelial growth factor. *J Endocrinol*, **168**, 409-416.
- Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein & W. Wahli, 1992: Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, **68**, 879-887.

- Dunn-Albanese, L. R., W. E. 4th. Ackerman, Y. Xie, J. D. Iams & D. A. Kniss, 2004: Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cyclooxygenase-2 in human term parturition. *Am J Obstet Gynecol*, **190**, 809-816.
- Endo, T., H. Henmi, T. Goto, Y. Kitajima, T. Kiya, A. Nishikawa, K. Manase, H. Yamamoto & R. Kudo, 1998: Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured luteal cells. *Gynecol Endocrinol*, **12**, 29-34.
- Engel, E., R. Klein, W. Baumgärtner & B. Hoffmann, 2005: Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus. *Anim Reprod Sci*, **87**, 163-176.
- Estergreen, V. L., Jr., O. L. Frost, W. R. Gomes, R. E. Erb & J. F. Bullard, 1967: Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J Dairy Sci*, **50**, 1293-1295.
- Fanjul, L. F., C. M. Ruiz de Galarreta & A. J. Hsueh, 1983: Progestin augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **112**, 405-407.
- Fernandes, P. A., R. A. Bowen, A. C. Kostas, H. R. Sawyer, T. M. Nett & P. N. Olson, 1987: Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol Reprod*, **37**, 804-811.
- Ferrara, N. & B. Keyt, 1997: Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS*, **79**, 209-232.
- Findlay, J. K., 1986: Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol*, **111**, 357-366.
- Fitz, T. A., P. B. Hoyer & G. D. Niswender, 1984: Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. I. Stimulatory effects of prostaglandins E1, E2 and I2. *Prostaglandins*, **28**, 119-126.

- Fournier, T., K. Handschuh, V. Tsatsaris, J. Guibourdenche & D. Evain-Brion, 2008a: Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*, **77**, 161-170.
- Fournier, T., P. Thérond, K. Handschuh, V. Tsatsaris & D. Evain-Brion, 2008b: PPAR gamma and early human placental development. *Curr Med Chem*, **15**, 3011-3024.
- Fraser, H. M., S. E. Dickson, S. F. Lunn, C. Wulff, K. D. Morris, V. A. Carroll & R. Bicknell, 2000: Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*, **141**, 995-1000.
- Fraser, H. M. & C. Wulff, 2003: Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*, **1**, 88.
- Fridén, B. E., A. Wallin & M. Brännström, 2000: Phase-dependent influence of nonsteroidogenic cells on steroidogenesis and prostaglandin production by the human corpus luteum. *Fertil Steril*, **73**, 359-365.
- Froment, P., S. Fabre, J. Dupont, C. Pisselet, D. Chesneau, B. Staels & P. Monget, 2003: Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biol Reprod*, **69**, 1665-1674.
- Froment, P., F. Gizard, D. Defever, B. Staels, J. Dupont & P. Monget, 2006: Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol*, **189**, 199-209.
- Fuchs, A. R., K. Goeschen, A. B. Rasmussen & J. V. Rehnström, 1984: Cervical ripening and plasma prostaglandin levels. Comparison of endocervical and extra-amniotic PGE<sub>2</sub>. *Prostaglandins*, **28**, 217-227.
- Gasic, S., Y. Bodenbun, M. Nagamani, A. Green & R. J. Urban, 1998: Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells. *Endocrinology*, **139**, 4962-4966.



- Giaginis, C., E. Spanopoulou & S. Theocharis, 2008: PPAR gamma signaling pathway in placental development and function: a potential therapeutic target in the treatment of gestational diseases. *Expert Opin Ther Targets*, **12**, 1049-1063.
- Gibori, G., R. Rodway & I. Rothchild, 1977: The luteotrophic effect of estrogen in the rat: prevention by estradiol of the luteolytic effect of an antiserum to luteinizing hormone in the pregnant rat. *Endocrinology*, **101**, 1683-1689.
- Gräf, K. J., 1978: Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fertil*, **52**, 9-14.
- Greene, M. E., B. Blumberg, O. W. McBride, H. F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene & S. D. Nimer, 1995: Isolation of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, **4**, 281-299.
- Gregoraszczuk, E. L., 1996: Large and small cells of the porcine corpus luteum: differential capacity to secrete estradiol and aromatize exogenous androgen during mid- and late luteal phase. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **104**, 278-283.
- Grether, B. M., A. E. Friess & M. H. Stoffel, 1998: The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (day 30-44): an ultrastructural, ultrahistochemical and lectinhistochemical investigation. *Anat Histol Embryol*, **27**, 95-103.
- Grosser, O., 1927: Vergleichende Placentationslehre in Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere. *Verlag J.F. Bergmann, München*.
- Hashii, K., H. Fujiwara, S. Yoshioka, N. Kataoka, S. Yamada, T. Hirano, T. Mori, S. Fujii & M. Maeda, 1998: Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Hum Reprod*, **13**, 2738-2744.

- Hazzard, T. M. & F. Stormshak, 1997: Down-regulation of oxytocin receptors and secretion of prostaglandin F2 alpha after chronic treatment of ewes with estradiol-17beta. *Biol Reprod*, **56**, 1576-1581.
- Hehnke, K. E., L. K. Christenson, S. P. Ford & M. Taylor, 1994: Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. *Biol Reprod*, **50**, 10-15.
- Herschman, H. R., 1996: Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 125-140.
- Hoffmann, B., H. J. Kyrein & M. L. Ender, 1973: An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Horm Res*, **4**, 302-310.
- Hoffmann, B., R. Höveler, S. H. Hasan & K. Failing, 1992: Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J Reprod Fertil*, **96**, 837-845.
- Hoffman, B., R. Höveler, B. Nohr & S. H. Hasan, 1994: Investigation on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non-conjugated oestrogens. *Exp Clin Endocrinol*, **102**, 185-189.
- Hoffmann, B., A. Riesenbeck & R. Klein, 1996: Reproductive endocrinology of bitches. *Anim Reprod Sci*, **42**, 275-288.
- Hoffmann, B., A. Riesenbeck, D. Schams & B. G. Steinetz, 1999: Aspects of hormonal control of normal and induced parturition in the dog. *Reprod Domest Anim*, **34**, 219-226.
- Hoffmann, B. & G. Schuler, 2002: The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol*, **23**, 309-320.
- Hoffmann, B., F. Büsges & W. Baumgärtner, 2004a: Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. *Reprod Domest Anim*, **39**, 391-395.

- Hoffmann, B., F. Büsges, E. Engel, M. P. Kowalewski & P. Papa, 2004b: Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod Domest Anim*, **39**, 232-240.
- Hubler, M., S. Arnold, M. Casal, M. Flückiger, B. Hauser, L. Corboz & P. Rüsch, 1991: Use of a low dose prostaglandin F2 alpha in bitches. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **133**, 323-329.
- Issemann, I. & S. Green, 1990: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650.
- Johnson, W. H., J. G. Manns, W. M. Adams & R. J. Mapletoft, 1981: Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Can Vet J*, **22**, 288-290.
- Kato, K., H. Satoh, Y. Endo, D. Yamada, S. Midorikawa, W. Sato, K. Mizuno, T. Fujita, K. Tsukamoto & T. Watanabe, 1999: Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPAR gamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, **258**, 431-435.
- Kim, J., M. Sato, Q. Li, J. P. Lydon, F. J. Demayo, I. C. Bagchi & M. K. Bagchi, 2008: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol*, **28**, 1770-1782.
- Klagsbrun, M., 1991: Regulators of angiogenesis: stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. *J Cell Biochem*, **47**, 199-200.
- Komar, C. M., O. Braissant, W. Wahli & T. E. Curry, Jr., 2001: Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology*, **142**, 4831-4838.
- Komar, C. M. & T. E. Curry, Jr., 2002: Localization and expression of messenger RNAs for the peroxisome proliferator-activated receptors in ovarian tissue from naturally cycling and pseudopregnant rats. *Biol Reprod*, **66**, 1531-1539.

- Komar, C. M., 2005: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol*, **3**, 41.
- König, H. E. & H.-G. Liebich, 1999: Anatomie der Haussäugetiere. *F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, **Band 2**, 135-151.
- Kowalewski, M., 2007: Untersuchungen zur Rolle des Prostaglandin Systems in der Regulation der Corpus luteum Funktion der Hündin durch Erfassung der Expression von Cyclooxygenase 1 und -2 (Cox1, -2), Prostaglandin F2a Synthase (PGFS), Prostaglandin E2 Synthase (PGES) und Prostaglandin F2a Rezeptor (PGFR). *Inaugurale Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Kowalewski, M. P. & B. Hoffmann, 2008: Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **116**, 158-161.
- Kowalewski, M. P., H. M. Mutembei & B. Hoffmann, 2008a: Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus. *Anim Reprod Sci*, **109**, 319-329.
- Kowalewski, M. P., H. M. Mutembei & B. Hoffmann, 2008b: Canine prostaglandin F2 alpha receptor (FP) and prostaglandin F2 alpha synthase (PGFS): molecular cloning and expression in the corpus luteum. *Anim Reprod Sci*, **107**, 161-175.
- Kowalewski, M. P., H. B. Beceriklisoy, S. Aslan, A. R. Agaoglu & B. Hoffmann, 2009a: Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterin induced luteolysis in the bitch. *Anim Reprod Sci*, **116**, 129-138.
- Kowalewski, M. P., M. T. Dyson, P. R. Manna & D. M. Stocco, 2009b: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in gonadal steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Reprod Fertil Dev*, **21**, 909-922.

- Kowalewski, M. P., H. B. Beceriklisoy, C. Pfarrer, S. Aslan, H. Kindahl, I. Küçükaslan & B. Hoffmann, 2010: Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogesterone induced parturition. *Reproduction*. 139, 655-664.
- Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama, K. Eto, Y. Tsubamoto, A. Okuno, K. Murakami, H. Sekihara, G. Hasegawa, M. Naito, Y. Toyoshima, S. Tanaka, K. Shiota, T. Kitamura, T. Fujita, O. Ezaki, S. Aizawa, T. Kadowaki & et al., 1999: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, **4**, 597-609.
- Lebovic, D. I., M. Kir & C. L. Casey, 2004: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Fertil Steril*, **82 Suppl 3**, 1008-1013.
- Leiser, R. & P. Kaufmann, 1994: Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, **102**, 122-134.
- Levy, R., S. D. Smith, K. Chandler, Y. Sadovsky & D. M. Nelson, 2000: Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C982-988.
- Lobel, B. L. & E. Levy, 1968: Enzymic correlates of development, secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **Suppl 132**, 135-163.
- Löhrke, B., T. Viergutz, S. K. Shahi, R. Pöhland, K. Wollenhaupt, T. Goldammer, H. Walzel & W. Kanitz, 1998: Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma in lutein cells. *J Endocrinol*, **159**, 429-439.
- Lund, S. A., J. Murdoch, E. A. Van Kirk & W. J. Murdoch, 1999: Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol Reprod*, **61**, 388-392.

- Madore, E., N. Harvey, J. Parent, P. Chapdelaine, J. A. Arosh & M. A. Fortier, 2003: An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F2 alpha in the bovine endometrium. *J Biol Chem*, **278**, 11205-11212.
- Mariani, T. C., C. do Prado, L. G. Silva, F. A. Paarmann, M. C. Lima, I. Carvalho, D. B. Campos, L. P. Artoni, F. J. Hernandez-Blazquez & P. C. Papa, 2006: Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestrus. *Theriogenology*, **66**, 1715-1720.
- McCracken, J. A., E. E. Custer & J. C. Lamsa, 1999: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev*, **79**, 263-323.
- Milvae, R. A. & W. Hansel, 1983: Prostacyclin, prostaglandin F2 alpha and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. *Biol Reprod*, **29**, 1063-1068.
- Miyamoto, A., H. von Lützow & D. Schams, 1993: Acute actions of prostaglandin F2 alpha, E2, and I2 in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. *Biol Reprod*, **49**, 423-430.
- Mu, Y. M., T. Yanase, Y. Nishi, N. Waseda, T. Oda, A. Tanaka, R. Takayanagi & H. Nawata, 2000: Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 710-713.
- Muir, A. V., M. B. Hodgins, J. A. Milne & H. Young, 1970: The presence of hydroxysteroid dehydrogenases in mammalian sebaceous structures. *Br J Dermatol*, **83**, 291-295.
- Murdoch, W. J., L. E. Steadman & E. L. Belden, 1988: Immunoregulation of luteolysis. *Med Hypotheses*, **27**, 197-199.
- Nelson, D. & M. Cox, 2001: Lehninger Biochemie. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*.
- Neuvians, T. P., B. Berisha & D. Schams, 2004: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol Reprod Dev*, **67**, 389-395.

- Nickel, R., A. Schummer & E. Seiferle, 2004: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. *Parey Verlag, Berlin*, 9. Auflage.
- Nishiyama, T., S. Tsumagari, M. Ito, J. Kimura, G. Watanabe, K. Taya & M. Takeishi, 1999: Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anat Histol Embryol*, **28**, 125-129.
- Niswender, G. D., J. L. Juengel, P. J. Silva, M. K. Rollyson & E. W. McIntush, 2000: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev*, **80**, 1-29.
- Nohr, B., B. Hoffmann & B. E. Steinetz, 1993: Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. *J Reprod Fertil Suppl*, **47**, 542-543.
- Noakes, D. E., T. J. Parkinson & G. C. W. England, 2009: Veterinary Reproduction and Obstetrics. *Saunders Elsevier, London*, 9. Auflage.
- Noll, S. & S. Schaub-Kuhnen, 2000: Praxis der Immunhistochemie. *Urban & Fischer Verlag, München*.
- Okkens, A. C., S. J. Dieleman, M. M. Bevers, A. A. Lubberink & A. H. Willemse, 1986: Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *J Reprod Fertil*, **77**, 187-192.
- Okkens, A. C., M. M. Bevers, S. J. Dieleman & A. H. Willemse, 1990: Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *Vet Q*, **12**, 193-201.
- Olofsson, J., E. Norjavaara & G. Selstam, 1992: Synthesis of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha, E<sub>2</sub> and prostacyclin in isolated corpora lutea of adult pseudopregnant rats throughout the luteal life-span. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **46**, 151-161.
- Olofsson, J. & P. C. Leung, 1994: Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol*, **100**, 87-91.

- Olson, P. N., R. A. Bowen, M. D. Behrendt, J. D. Olson & T. M. Nett, 1982: Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod*, **27**, 1196-1206.
- Olson, P. N., T. M. Nett, R. A. Bowen, H. R. Sawyer & G. D. Niswender, 1989: Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J Reprod Fertil Suppl*, **39**, 27-40.
- Onclin, K., L. D. Silva, I. Donnay & J. P. Verstegen, 1993: Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl*, **47**, 403-409.
- Onclin, K. & J. P. Verstegen, 1997: Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, **51**, 203-208.
- Pakrasi, P. L. & A. K. Jain, 2008: Cyclooxygenase-2 derived PGE2 and PGI2 play an important role via EP2 and PPAR delta receptors in early steps of oil induced decidualization in mice. *Placenta*, **29**, 523-530.
- Papa, P., 2001: Darstellung von Estradiol-17b und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus. *Inaugurale Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld & C. K. Glass, 2005: A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR gamma. *Nature*, **437**, 759-763.
- Pate, J. L., 1995: Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *J Reprod Fertil Suppl*, **49**, 365-377.
- Pate, J. L., 1996: Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, **45**, 1381-1397.



- Patek, C. E. & J. Watson, 1983: Factors affecting steroid and prostaglandin secretion by reproductive tissues of cycling and pregnant sows in vitro. *Biochim Biophys Acta*, **755**, 17-24.
- Petroff, M. G., B. K. Petroff & J. L. Pate, 2001: Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction*, **121**, 753-760.
- Pierce, K. L., T. J. Bailey, P. B. Hoyer, D. W. Gil, D. F. Woodward & J. W. Regan, 1997: Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J Biol Chem*, **272**, 883-887.
- Pridjian, G., V. Schmit & J. Schreiber, 1987: Medroxyprogesterone acetate: receptor binding and correlated effects on steroidogenesis in rat granulosa cells. *J Steroid Biochem*, **26**, 313-319.
- Redmer, D. A., Y. Dai, J. Li, D. S. Charnock-Jones, S. K. Smith, L. P. Reynolds & R. M. Moor, 1996: Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil*, **108**, 157-165.
- Redmer, D. A., V. Doraiswamy, B. J. Bortnem, K. Fisher, A. Jablonka-Shariff, A. T. Grazul-Bilska & L. P. Reynolds, 2001: Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, **65**, 879-889.
- Reimers, T. J., R. D. Phemister & G. D. Niswender, 1978: Radioimmunological measurement of follicle stimulating hormone and prolactin in the dog. *Biol Reprod*, **19**, 673-679.
- Reynolds, L. P., S. D. Killilea & D. A. Redmer, 1992: Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J*, **6**, 886-892.
- Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly & C. K. Glass, 1998: The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.

- Romagnoli, S. E., M. Cela & F. Camillo, 1991: Use of prostaglandin F2 alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **21**, 487-499.
- Rothchild, I., 1981: The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res*, **37**, 183-298.
- Sakumoto, R., S. Murakami & K. Okuda, 2000: Tumor necrosis factor alpha stimulates prostaglandin F2 alpha secretion by bovine luteal cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phospholipase A2 pathways. *Mol Reprod Dev*, **56**, 387-391.
- Schaiff, W. T., M. G. Carlson, S. D. Smith, R. Levy, D. M. Nelson & Y. Sadovsky, 2000: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3874-3881.
- Schaiff, W. T., Y. Barak & Y. Sadovsky, 2006: The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*, **249**, 10-15.
- Schnorr, B. & M. Kressin, 2006: Embryologie der Haustiere. *Enke Verlag, Stuttgart*, 5. Auflage.
- Schoppee, P. D., J. C. Garmey & J. D. Veldhuis, 2002: Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol Reprod*, **66**, 190-198.
- Schuler, G., U. Teichmann, M. P. Kowalewski, B. Hoffmann, E. Madore, M. A. Fortier & K. Klisch, 2006: Expression of cyclooxygenase-II (COX-II) and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20alpha-HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. *Placenta*, **27**, 1022-1029.
- Shelton, K., T. J. Parkinson, M. G. Hunter, R. W. Kelly & G. E. Lamming, 1990: Prostaglandin E2 as a potential luteotrophic agent during early pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil*, **90**, 11-17.

- Shu, H., B. Wong, G. Zhou, Y. Li, J. Berger, J. W. Woods, S. D. Wright & T. Q. Cai, 2000: Activation of PPAR alpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 345-349.
- Skarzynski, D. J. & K. Okuda, 1999: Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F2 alpha is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. *Biol Reprod*, **60**, 1292-1298.
- Sonnack, M., 2009: Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte. *Inaugurale Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen*.
- Staels, B., 2005: PPAR gamma and atherosclerosis. *Curr Med Res Opin*, **21 Suppl 1**, S13-20.
- Steinetz, B. G., L. T. Goldsmith & G. Lust, 1987: Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. *Biol Reprod*, **37**, 719-725.
- Stocco, D. M. & T. C. Sodeman, 1991: The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem*, **266**, 19731-19738.
- Stocco, D. M. & B. J. Clark, 1996: Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, **17**, 221-244.
- Stocco, C. O. & R. P. Deis, 1998: Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin F2 alpha in LH-induced luteolysis in pregnant rat. *J Endocrinol*, **156**, 253-259.
- Stouffer, R. L., J. C. Martinez-Chequer, T. A. Molskness, F. Xu & T. M. Hazzard, 2001: Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*, **32**, 567-575.
- Strauss, J. F. 3rd., J. Sokoloski & P. Caploe, 1975: On the role of prostaglandins in parturition in the rat. *Endocrinology*, **96**, 1040-1043.

- Stys, S. J., B. L. Dresser, T. E. Otte & K. E. Clark, 1981: Effect of prostaglandin E2 on cervical compliance in pregnant ewes. *Am J Obstet Gynecol*, **140**, 415-419.
- Tamanini, C. & M. De Ambrogi, 2004: Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim*, **39**, 206-216.
- Tarrade, A., R. Lai Kuen, A. Malassiné, V. Tricottet, P. Blain, M. Vidaud & D. Evain-Brion, 2001a: Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest*, **81**, 1199-1211.
- Tarrade, A., K. Schoonjans, J. Guibourdenche, J. M. Bidart, M. Vidaud, J. Auwerx, C. Rochette-Egly & D. Evain-Brion, 2001b: PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology*, **142**, 4504-4514.
- Tarrade, A., K. Schoonjans, L. Pavan, J. Auwerx, C. Rochette-Egly, D. Evain-Brion & T. Fournier, 2001c: PPAR gamma/RXR alpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5017-5024.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari & B. M. Spiegelman, 1994: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, **8**, 1224-1234.
- Toth, B., M. Bastug, I. Mylonas, C. Scholz, J. Makovitzky, S. Kunze, C. Thaler, K. Friesse & U. Jeschke, 2009: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in normal human pregnancy and miscarriage. *Acta Histochem*, **111**, 372-378.
- Tsutsui, T., 1989: Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, **39**, 269-275.
- Vermeirsch, H., P. Simoens & H. Lauwers, 2000: Immunohistochemical detection of the estrogen receptor alpha and progesterone receptor in the canine pregnant uterus and placental labyrinth. *Anat Rec*, **260**, 42-50.

- Waite, L. L., E. C. Person, Y. Zhou, K. H. Lim, T. S. Scanlan & R. N. Taylor, 2000: Placental peroxisome proliferator-activated receptor gamma is up-regulated by pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3808-3814.
- Watson, E. D. & P. L. Sertich, 1990: Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. *J Reprod Fertil*, **88**, 223-229.
- Wiltbank, M. C. & J. S. Ottobre, 2003: Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol*, **1**, 91.
- Wuttke, W., S. Spiess, I. Knoke, L. Pitzel, S. Leonhardt & H. Jarry, 1998: Synergistic effects of prostaglandin F2 alpha and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig. *Biol Reprod*, **58**, 1310-1315.
- Xin, X., S. Yang, J. Kowalski & M. E. Gerritsen, 1999: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 9116-9121.



## 10 Anhang

### 10.1 Puffer und Lösungen

#### Formaldehyd 4%, gepuffert, pH 7,0, für die Gewebefixierung (Formol nach Lillie)

Formol (40% Formaldehydlösung)	500 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	32,5 g
Aqua dest.	Ad 500 ml

#### Phospatpuffer für die Aufbewahrung von Gewebeproben nach Formalin-Fixierung:

##### *Lösung 1:*

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

##### *Lösung 2:*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

##### Gebrauchslösung:

Lösung 1:	14,15 ml
Lösung 2:	35,85 ml

Die Proben werden 24 Stunden in Formol nach Lilli fixiert. Danach zum Auswaschen des Fixans werden die Gewebeproben in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2; Mix aus Lösung 1 und 2) bis zu einer Woche aufbewahrt. Während dieser Zeit soll der Puffer täglich gewechselt werden. Anschliessend werden die Gewebeproben über jeweils 24 Stunden in 30-, 50-, 70% Alkohol dehydriert. Danach erfolgt die Einbettung in Paraffin.

#### 10 M Citratpuffer für die Mikrowellenbehandlung der Gewebeschnitte (pH 6,0):

##### *Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure*

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	21,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

##### *Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat*

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$	29,41 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

*Gebrauchslösung:*

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua dest.	450 ml
	<hr/> 500 ml

10 x IHC-Puffer pH 7,2 – 7,4:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g
Aqua dest	ad 1000 ml

1 x IHC-Puffer/0,3% Triton X-100 pH 7,2 – 7,4

10 x IHC-Puffer	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

pH 7,2 – 7,4 einstellen, anschliessend 3 ml Triton X-100 zugeben

Net-2 Puffer pH 7,4 (Lagerung bei +4 °C):

NaCl (300 mM)	4,384 g
Tris-HCl (50 mM)	1,97 g
Nonidet P (NP) -40 (0,05%)	125 µl
H <sub>2</sub> O	ad 250 ml



4x Sample Puffer für Western Blot, Lagerung bei -20 °C):

H <sub>2</sub> O	16 ml
0,5 M Tris pH 6.8	4 ml
Glycerol	3,2 ml
SDS 10%	6,4 ml
β-Mercaptoethanol	1,6 ml
0,2% Bromphenolblau	32 ml

0,5 M EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat):

EDTA	37,22 g
Aqua dest.	ca. 160 ml

Mit ca. 4 g NaOH-Plätzchen auf pH 8,0 einstellen (erst dann geht EDTA in Lösung).  
Anschliessend mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen.

Lower Tris Puffer pH 8,8:

Tris Base	31,46 g
Tris HCl	3,72 g
SDS 10%	8 ml
Aqua dest.	ad 200 ml

Upper Tris Puffer pH 6,8

Tris Base	0,182 g
Tris HCl	3,72 g
SDS 10%	2 ml
Aqua dest.	ad 50 ml

### Running-Puffer 10x

Tris Base	30,25 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Gebrauchslösung: 1 x

### Transfer-Puffer 10 x:

Tris Base	24,2 g
Glycin	112,4 g
SDS	1 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

*Gebrauchslösung:*

Methanol (10%)	100 ml
10x Transfer-Puffer	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

### PBS (Phosphat buffer saline) 10 x:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

PBS (Phosphat buffer saline) mit 0,25% Tween 20 für Western Blot:

PBS 10 x	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
Tween 20	2,5 ml

0.1 M Glyzin pH 2,6 für Western Blot stripping

Glyzin	1,5 g
Aqua dest.	ad 200 ml

TBE (10 x)

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0.5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
Aqua dest.	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung: 1 x

## 10.2 Reagenzien

- 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- 40% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (2,6%) (BioRad, Reinach, CH)
- 6 x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- Agarose, ultraPure, Electrophoresis Drag (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D)
- Anti-Kaninchen-IgG Antikörper aus der Ziege (biotinyliert, BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Anti-Maus-IGg Antikörper aus der Ziege (biotinyliert, BA-2000; Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- APS (Ammonium Persulfate; BioRad, Rheinach, CH)
- Bovine Serum Albumine (BSA) 2mg/ml (BioRad, Reinach, CH)
- Bradford-Lösung (Badford Quick Start, BioRad, Reinach, CH)
- Bromphenolblau (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$  (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; Merck, Darmstadt, D)
- $C_6H_8O_7 \times H_2O$  (Zitronensäure- Monohydrat ; Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Chloroform, Rotisolv® (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- DAB (Liquid DAB+Substrate, Dako, Baar, CH)
- DNase I, RNase-frei ( Roche Molecular Biochemicals, Basel, CH)
- E. coli (XL-1 blue) (Stratagene, Sevaign, B)
- EDTA (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Ethanol (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- Ethidiumbromid 1% (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- FastStart Universal Probe Master (ROX) MasterMix (Roche, Basel, CH)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- Glycerol Rotipuran®: 99,5% wasserfrei (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- Glycin (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Haemalaun Mayer sauer KA (Kantonsapotheke Zürich, CH)
- HCl, Salzsäure rauchend, 37% (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Immun-Star™ WesernC™ Kit (BioRad, Reinach, CH)

- Isopropanol/2-Propanol, Rotipuran® (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- $K_2HPO_4$  (Kaliumphosphat monobasisch; Merck, Darmstadt, D)
- KCl (Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, D)
- $KH_2PO_4$  (Kaliumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt, D)
- Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts (BioRad, Reinach, CH)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- $Na_2HPO_4$  (Di-Natriumhydrogenphosphat reinst; Merck, Darmstadt, D)
- $Na_2HPO_4 \times H_2O$  (Di-Natriumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt, D)
- NaCl (Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, D)
- NaOH (Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt, D)
- Nonidet P-40 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Normal Goat Serum (KPL, Maryland, USA)
- Normal Rabbit IgG, (Cell Signaling Technology Inc., Technology Inc., Danvers, MA)
- PPAR $\gamma$ -Antikörper (monoklonaler IgG-Antikörper, PPAR $\gamma$  81B8 Rabbit mAb, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA)
- PureYield™ Plasmid Maxiprep System Kit (Promega, Dübendorf, CH)
- RNAlater (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden, D)
- RNase-Inhibitor (Riboloc RNase Inhibitor, 40U/ $\mu$ l, Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- SDS (Sodiumdodecylsulfat; Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- SuperSignal® West Femto aximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Temed (Tetraethylenmethyldiamin; BioRad, Reinach, CH)
- TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Dübendorf, CH)
- Tris Base (Trizma® base, Minimum 99,9% Titration, Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Tris-HCl (Trizma® Hydrochlorid, Reagent Grade; Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Triton-X 100 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Trizol ® Reagent (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- Vectastain® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories. Inc., Burlingame USA)

- Vimentin-Antikörper (Clone Vim 3B4, DakoCytomation, Glostrup, DK)
- Wasserstoffperoxid, 30%, (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Xylol (Merck, Darmstadt, D)
- Zitronensäure- Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, D)

### 10.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- 0,5ml Kunststoffreaktionsröhrchen (Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH)
- 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- 96-well optical plates (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- Adhäsions-Objektträger (SuperFrost Plus®, Menzelgläser, Braunschweig, D)
- Aerosol-Resistant-Tips® gestopfte Pipettenspitzen (Molecular Bio Products Inc., San Diego, California, USA)
- Coverplates (Shandon Coverplates™, Cheshire, UK)
- Digitalkamera (Colorview 12, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH)
- Eindeckanlage Meisei (medite Medizintechnik, Nunningen, CH)
- Einmalmesser für Mikrotom Shandon MB DynaSharp Microtome Blade (Thermo, Histocom AG, Zug, CH)
- Einwegküvetten (Semimicrovolume Cuvette, Quartz, BioRad, Reinach, CH)
- Fedegari Autoklav (Fischer Scientific, Wohlen, CH)
- Handhomogenisator (VWR, Dietikon, CH)
- Handschuhe sempercare® (Semperit technische Produkte, Wien, A)
- Heizplatte/Magnetrührer Ikamak RTC (Ika Labortechnik, Staufen, CH)
- Kühlschrank Elektrolux Save Energy (Elektrolux, Wallisellen, CH)
- Laborwasseraufbereitungsanlage Barnstead EasyPure II (Thermo Scientific, Zürich, CH)
- Mastercycler Gradient (Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH)
- Mikrowelle Polaron Division (BioRad, Rheinach, CH)
- pH-Meter Orion (Hügli Labortec, Abtwil, CH)
- Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- PVDF-Membran (Immuno-Blot PVDF Membran, BioRad, Basel, CH)
- Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica Microsystems, Nussloch, D)
- Schüttler KS 15-Control (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE)
- Software analySIS Pro® (Version 5.0, Soft Imaging System GmbH)
- Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA)
- Statistikprogramm ImageJ 1.38x (Wayne Rasband, NIH, USA)
- Tank-Blot-Systems (Criterion Blotter, BioRad, Basel, CH)

- Tiefgefrierschrank -80 °C (Sanyo Labtec, CH)
- Tiefgefrierschrank, -20 °C (Bauknecht, Lenzburg, CH)
- trUView Cuvettes (BioRad, Reinach, CH)
- Ultraturrax (Homogenisator VDI 12) (VWR, Dietikon, CH)
- UV-Spektrophotometer (Smart Spec<sup>TM</sup> Plus, BioRad, Reinach, CH)
- Vortexer Genie 2TM (ABS, Dietikon, CH)
- Waage Atilon (Acculab, Sartorius Group, D)
- Wärmeschrank (Binder, Binder GmbH, Tuttlingen, D)
- Wasserbad TFB 35 (medite Medizintechnik, Nunningen, CH)
- Zentrifuge Hitachi CT 15 RE Himac (VWR, Leuven, B)



## 11 Danksagung

Mein Dank geht an alle, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere an:

Herrn **Mariusz Kowalewski, PhD**, der mir dieses interessante Thema zur Bearbeitung überlassen hat und mir das gesamte Material für die Versuche zur Verfügung gestellt hat. Er ist mir immer mit seinem kompetenten fachlichen Wissen zur Seite gestanden, sei es bei den praktischen Arbeiten im Labor oder der theoretischen Belangen und Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. med. vet. Alois Boos** für die Übernahme des Referats und **PD Dr. med. vet. Iris Reichler** für die Übernahme des Koreferats und die sorgfältige Durchsicht dieses Manuskripts.

Die beiden Laboranten Frau **Sissi Högger** im Histologie-Labor und Herrn **Urs Büchler** im molekularbiologischen Labor: Vielen Dank für die Geduld, die vielen guten Ratschläge und die tatkräftige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten sowie das ungezwungene Arbeitsklima.

Frau **Jeanne Peter** für ihre Hilfe bei der Bildbearbeitung und der graphischen Darstellung der Arbeit.

Alle **Mit-Doktoranden** für die gute Zeit im Büro, im Labor und auch nach der Arbeit. Sie haben immer wieder für gute Stimmung und originelle Überraschungen gesorgt. Diese Zeit wird mir in schöner Erinnerung bleiben.

Nicht zu vergessen sind meine Familie, alle Freunde und Bekannten, die mich während dieser Zeit unterstützt, er- und getragen haben.



## 12 Lebenslauf

<b>Name, Vorname</b>	Meyer, Andrea
<b>Geburtsdatum</b>	05.01.1981
<b>Geburtsort</b>	Frauenfeld, TG, CH
<b>Nationalität</b>	Schweiz
<b>Heimatort</b>	Willisau-Land, LU, CH
<b>März 1988 - Juli 1994</b>	Primarschule in Wängi, TG, CH
<b>August 1994 - Juli 1996</b>	Sekundarschule in Wängi, TG, CH
<b>August 1996 - Juli 2001</b>	Kantonsschule in Frauenfeld, TG, CH
<b>29. Juni 2001</b>	Matura, Kantonsschule in Frauenfeld, TG, CH
<b>Oktober 2001 - März 2003</b>	Studium der Biologie, 3 Semester, Universität Zürich, CH
<b>Oktober 2003 - Oktober 2008</b>	Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich, CH
<b>20. Oktober 2008</b>	Abschlussprüfung med. vet., Universität Zürich, CH
<b>Juni 2009 - Januar 2011</b>	Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Mariusz P. Kowalewski, PhD, am Veterinär-Anatomischen Institut der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, (Direktor Prof. Dr. med. vet. Alois Boos)
<b>Seit Januar 2009</b>	Assistenzstelle, Tierklinik Rossweid, Gockhausen, ZH, CH